



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη της α1- αντιθρυψίνης σε ασθενείς με Κοινή Ποικίλη
Ανοσοανεπάρκεια**

Μαργαριτοπούλου Ολυμπία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος, 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**Study of $\alpha 1$ - antitrypsin in patients with Common Variable
Immunodeficiency**

By

Margaritopoulou Olimpia

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical Applications in Molecular Medicine.

Larisa, October, 2018

Στο μπαμπά μου, για όλη του
την αγάπη.....

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ <i>SERPINA1</i>	11
1.1 <i>SERPINA1</i>	11
1.2 Α1-ΑΝΤΙΘΡΥΨΙΝΗ	13
1.3 ΑΑΤD	14
1.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΛΛΗΛΙΑ ΤΗΣ Α1ΑΤ	14
1.5 ΑΝΕΠΑΡΚΗ ΑΛΛΗΛΙΑ ΤΗΣ Α1ΑΤ	14
1.5.1 Ζ αλλήλιο	15
1.5.2 S αλλήλιο	17
1.6 ΜΗΔΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ Α1ΑΤ	17
1.7 ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ	18
1.8 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ	19
1.9 ΑΑΤD ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	22
1.10 ΑΑΤD ΚΑΙ CVID	23
2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ	23
2.1 PADs.....	23
2.1.1 Κλινικές Εκδηλώσεις των PADs	24
2.1.2 Διάγνωση.....	28
2.2 CVID	28
2.2.1 Κλινική Εικόνα CVID	29
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ.....	30
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ	32
1.1 Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες	32
2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ	33
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ	34
3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα.....	34
3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	35
3.2.1 PCR για το γονίδιο <i>SERPINA1</i>	35
3.2.2 Real Time PCR.....	39
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε γέλη αгарόζης.....	41
3.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων PCR προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing)	42

3.2.5 Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων κατά Sanger	42
3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	42
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
4.1 Πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί την Α1ΑΤ	43
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ανεπάρκεια της α1 αντιθρυψίνης αποτελεί ένα σχετικά σπάνιο νόσημα το οποίο είναι αρκετά υποδιαγεγνωσμένο στην Ελλάδα. Η τυποποίησή του ήταν δυνατή μέχρι πρότινος, μόνο στο εξωτερικό. Ωστόσο, στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας έχουμε ξεκινήσει ήδη να μελετούμε το γονίδιο που κωδικοποιεί την α1-αντιθρυψίνη και είμαστε σε θέση να τυποποιούμε το νόσημα γενετικά. Έχει συσχετιστεί με πληθώρα άλλων νοσημάτων, ένα από τα οποία αποτελεί και η Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια- νόσημα με το οποίο ασχολείται επίσης κατά κόρον το εργαστήριό μας, έχοντας συγκεντρώσει αυτά τα χρόνια δείγματα ασθενών από όλη την Ελλάδα. Η μελέτη μας λοιπόν, αφορούσε τις αλλαγές που εντοπίζονται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α1-αντιθρυψίνη, και τη διερεύνηση του πιθανού ρόλου που μπορεί να διαδραματίζουν στις κλινικές εκδηλώσεις των ασθενών που πάσχουν από Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια. Συμβάλλοντας, κι εγώ η ίδια ενεργά, τόσο στο να ξεκινήσει να τυποποιείται η ανεπάρκεια της α1-αντιθρυψίνης στο εργαστήριό μας, όσο και η ερευνητική εργασία που πλαισιώνει το μεταπτυχιακό δίπλωμα εξειδίκευσής μου, αποτελούσε ταυτόχρονα μια πρόκληση και μια τεράστια ευκαιρία για εμένα.

Είχα την τιμή και την τύχη να συνεργαστώ με πολύ αξιόλογους ανθρώπους σε όλη μου την πορεία αυτό τον ένα χρόνο των Μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αναστάσιο Γερμενή, ο οποίος αφενός με δέχθηκε στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, αφετέρου δε δίστασε να μου προσφέρει τις πολύτιμες συμβουλές του καθόλη τη διάρκειά του.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου, Αναπληρωτή Καθηγητή κ.Ματθαίο Σπελέτα για τη διαρκή καθοδήγηση, τις γνώσεις που μου προσέφερε, την υπομονή και

τις παρεμβάσεις του καθόλη τη διάρκεια αυτού του ενός χρόνου, από τον σχεδιασμό έως τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

Είχα την τύχη να έχω εξαιρετικούς καθοδηγητές σε όλη τη διαδρομή που με συμβούλεψαν, με υποστήριξαν και με βοήθησαν ουσιαστικά.

Ευχαριστώ, επίσης, την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ευθυμία Πετεινάκη για τις γνώσεις που μου προσέφερε όσον αφορά το μάθημα της Μοριακής Μικροβιολογίας του Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου τις Ειρήνη Σεβδαλή, Γερασιμίνα Τσιντή, Νάνσυ Φουσίκα, Αδάμ Μολυβδά για την αμέριστη βοήθεια, τη στήριξη, την υπομονή, την άψογη συνεργασία και όλες τις γνώσεις που μου προσέφεραν από την αρχή μέχρι το τέλος. Αισθάνομαι πολύ τυχερή που γνώρισα ανθρώπους τόσο αξιόλογους, που με ανιδιοτέλεια στάθηκαν δίπλα μου προκειμένου να ανταπεξέλθω στις εργασίες που μου ανατέθηκαν και στα εμπόδια που προέκυψαν. Στη συνέχεια, ευχαριστώ την Ηλέκτρα Σοφού με την οποία ξεκίνησα και ολοκλήρωσα το Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα, για την άριστη συνεργασία και την ανταλλαγή ιδεών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς μου Δημήτρη και Σοφία και την αδελφή μου Αλεξάνδρα, για όλη τους τη στήριξη σε κάθε μου βήμα.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2017 με Οκτώβριο 2018, στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο πρόγραμμα «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

PADS (Primary Antibody Deficiencies) (Πρωτοπαθείς αντισωματικές ανεπάρκειες)

PCR (Polychain Reaction)

RT-PCR (Real Time Polychain Reaction)

AATD (antitrypsin deficiency)

AAT/A1AT (άλφα 1 αντιθρυψίνη)

SNPs (Single nucleotide polymorphisms)

CVID (Common Variable Immunodeficiency)

PI (Protease Inhibitor)

ΧΑΠ (Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια)

BTK (Bruton's Tyrosine Kinase)

BLNK (B cell linker protein)

BALF (Βρογχοκυψελιδικό υγρό)

Null alleles (Μηδενικά αλληλία)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η AATD αποτελεί ένα αρκετά υποδιαγεγνώσμενο νόσημα στην Ελλάδα, η τυποποίηση του οποίου μέχρι πρότινος πραγματοποιούνταν μόνο στο εξωτερικό. Στο εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας, έχουμε ήδη αρχίσει να μελετούμε το γονίδιο που κωδικοποιεί την α1-αντιθρυψίνη και πλέον είμαστε σε θέση να τυποποιούμε το νόσημα γενετικά. Η AATD έχει συσχετιστεί με πληθώρα άλλων νοσημάτων, ένα από τα οποία αποτελεί και η CVID – νόσημα με το οποίο ασχολείται κατά κόρον το εργαστήριό μας, έχοντας συγκεντρώσει όλα αυτά τα χρόνια δείγματα ασθενών από όλη την Ελλάδα. Στη βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια έρευνα που έχει μελετήσει τα πιο κοινά παθολογικά αλληλόμορφα S και Z που ευθύνονται για την εκδήλωση AATD, σε ασθενείς με CVID. Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία θα μελετηθεί ολόκληρο το γονίδιο που κωδικοποιεί την A1AT, στα πλαίσια πιθανών συσχετίσεων με τον κλινικό φαινότυπο ασθενών που πάσχουν από CVID.

Στην παρούσα μελέτη, εντάχθηκαν 61 ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με CVID, με ηλικιακό εύρος 12-70 ετών και μέση ηλικία τα 35,8 έτη. Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των εξονίων της A1AT με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και στη συνέχεια ανάλυση αλληλουχίας βάσεων κατά Sanger. Στο πλαίσιο της μελέτης, προτυποποιήθηκε και η ανίχνευση του Z παθολογικού αλληλόμορφου με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, για την ταχεία ανίχνευση της βλάβης.

Η ανάλυση αλληλουχίας βάσεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί την A1AT αποκάλυψε πλήθος σημειακών αντικαταστάσεων, σε ομοζυγωτία και ετεροζυγωτία, για όλους τους ασθενείς της μελέτης. Ειδικότερα, η Z παθογόνος μετάλλαξη (E366K [rs28929474]) ανιχνεύθηκε σε 3 ασθενείς και παρατηρήθηκαν : 4 παρενυμηνεύσιμες μεταλλάξεις (p.Arg125His [rs709932], p.Val237Ala [rs6647], p.Pro393Ser [rs61761869], p.Glu400Asp [rs1303]), 3 συνώνυμες μεταλλάξεις (p.Leu15= [rs147283849], p.Leu142= [rs20546], p.Leu323= [rs150455534]) και 2 ιντρονικές μεταλλάξεις (c.1066-25G>A και c.1066-87T>C), εκ των οποίων η c.1066-87T>C δεν είχε περιγραφεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία.

Από τις παραπάνω αλλαγές, οι 3 πολυμορφισμοί με rs1303, rs6647 και rs709932, οι οποίοι παρατηρήθηκαν σε υψηλότερη συχνότητα στο δείγμα της μελέτης, προέκυψε, πως δε σχετίζονται με τον κλινικό φαινότυπο των ασθενών που πάσχουν από CVID. Ωστόσο, η ανίχνευση του παθολογικού Z αλληλόμορφου, σε ένα μεγάλο ποσοστό της τάξης του 5%, με δεδομένη τη σπανιότητά του, φαίνεται να σχετίζεται με την ηπατική νοσολογία που εμφανίζεται ως κοινό σύμπτωμα και στους 3 ασθενείς. Προς περαιτέρω διερεύνηση και ενίσχυση αυτής της υπόθεσης, κρίνεται αναγκαίο μεγαλύτερο δείγμα ασθενών.

ABSTRACT

A1 antitrypsin deficiency remains under-diagnosed because of its variable clinical presentation and the poor knowledge of this disease by physicians. In our laboratory, we have already begun to study the gene encoding A1 antitrypsin, in order to be able to diagnose this genetic condition. ATTD has been associated with a variety of other diseases, including CVID - a disease that has become a major concern for our laboratory, the past 10 years. There is only one study, in the literature, that relates AATD and CVID. In this study, genotyping was used to define the distribution of S and Z deficiency alleles in order to investigate the occurrence of these deficiency alleles of AAT, in CVID patients. For the first time in the literature, *SERPINA1* gene will be investigated and its variants will be associated with the clinical complications of CVID.

We studied 61 patients diagnosed with CVID (30 female/31male), with mean age 35.8 years (range : 12 - 70 years). The molecular analysis of *SERPINA1* gene in the patients with CVID was performed using PCR-sequencing. In the samples of the CVID group was performed a detection of 4 missense mutations : (p.Arg125His [rs709932], p.Val237Ala [rs6647], p.Pro393Ser [rs61761869], p.Glu400Asp [rs1303]). We also detected 3 silence mutations (p.Leu15= [rs147283849], p.Leu142= [rs20546], p.Leu323= [rs150455534]), 2 intronic mutations (c.1066-25G> A and c.1066-87T> C) of which c.1066-87T> C had not been previously described in the literature. We also detected the pathogenic Z mutation (E342K [rs28929474]) in 3 patients.

The three most common variants (rs1303, rs6647 and rs709932) of the study, were not associated with the clinical phenotype of CVID patients. However, the detection of the deficiency Z allele in a large proportion of 5%, appears to be associated with liver disease. This data does however, indicate that a larger multi-centre study involving many more CVID patients, may be useful.

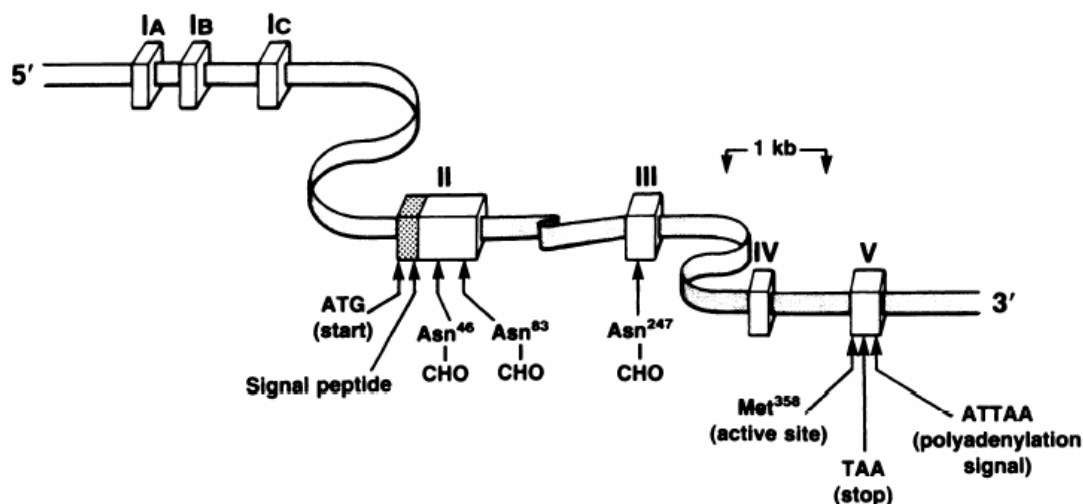
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *SERPINA1*

1.1 *SERPINA1*

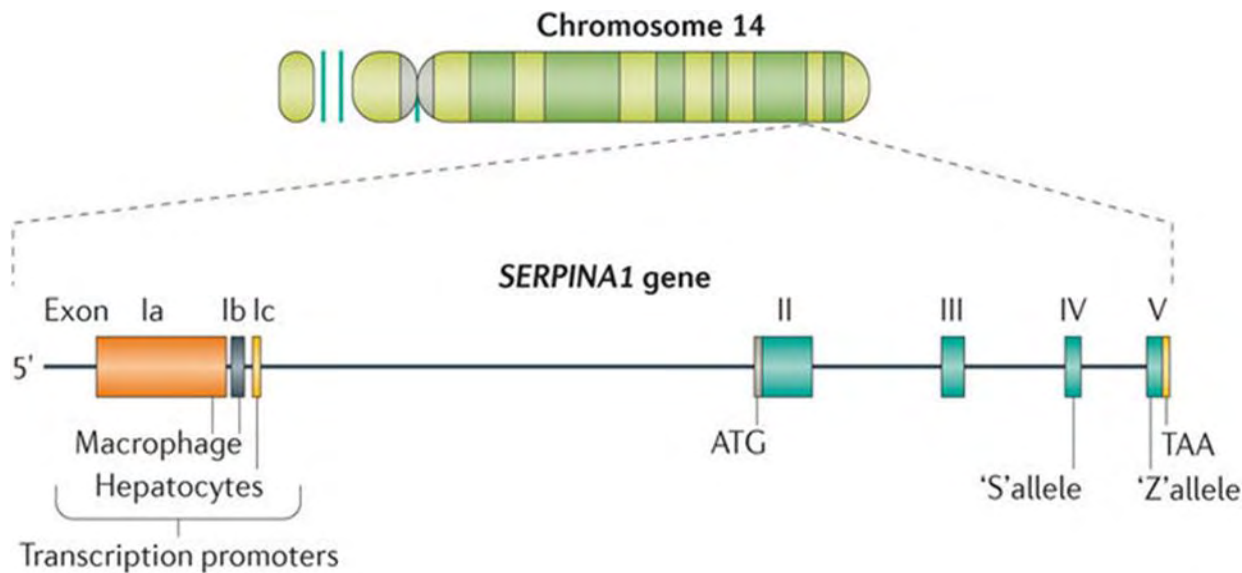
Το γονίδιο *SERPINA1*, κωδικοποιεί τον αναστολέα πρωτεάσης (Pi), εδράζεται στο χρωμόσωμα 14q32 [1] που είναι χαρτογραφημένο στην ίδια περιοχή μαζί με άλλα γονίδια-σερπίνες, όπως είναι οι : *SERPINA3* (α1-αντιχυμοθρυψίνη), *SERPINA4*, *SERPINA5* (PCI, αναστολέας πρωτεΐνης C), *SERPINA9*, *SERPINA10* (ZPI, πρωτεϊνικός Z-εξαρτώμενος αναστολέας πρωτεάσης) και *SERPINA11* [2]. Ο γενετικός τόπος Pi έχει μήκος 12.2 kb και αποτελείται από 4 κωδικά εξόνια, 3 μη κωδικά εξόνια και 6 ιντρόνια. (Εικόνα 2,3). Στην 5' ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *SERPINA1* υπάρχουν τα 3 μη κωδικά εξόνια (Ia, Ib, Ic), τα οποία ελέγχουν τη μεταγραφή του. Τα υπόλοιπα εξόνια (II-V) κωδικοποιούν την πρωτεΐνη α1 αντιθρυψίνη (A1AT). Το κωδικόνιο έναρξης (ATG) για τη μετάφραση του mRNA και το πεπτιδικό σήμα, βρίσκονται στο εξόνιο II, ενώ το κωδικόνιο λήξης (TAA) βρίσκεται στο εξόνιο V, ακολουθούμενο από το σήμα πολυαδενυλίωσης (ATTAA).

Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου, ελέγχεται κυρίως από δύο υποκινητές στην 5' αμετάφραστη (5'UTR) ρυθμιστική περιοχή. Ο υποκινητής που ελέγχει την έκφραση του γονιδίου στα ηπατοκύτταρα, βρίσκεται ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής σε αυτά τα κύτταρα, εντός του εσονίου 1C [2] [1][3]. Ενώ, μια εναλλακτική περιοχή υποκινητή, που βρίσκεται ανοδικά του εσονίου 1A, ελέγχει την έκφραση του γονιδίου *SERPINA1* σε άλλα κύτταρα, όπως είναι τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Επομένως, το πρωτογενές μετάγραφο που παράγεται στα ηπατοκύτταρα, είναι μικρότερο από τα άλλα 2 μετάγραφα που παράγονται από τα εξόνια 1A και 1B. Τουλάχιστον δύο διαφορετικές θέσεις έναρξης της μεταγραφής βρίσκονται εντός του εξονίου 1A, που χρησιμοποιείται τυπικά στα μονοκύτταρα, ενώ μια τρίτη θέση μεταγραφής βρίσκεται ανοδικά του εξονίου 1B. Πρόσθετες θέσεις έναρξης της μεταγραφής έχουν προταθεί για την έκφραση του γονιδίου *SERPINA1* σε κύτταρα κερατοειδούς, αλλά και σε κυτταρική σειρά πνεύμονα A549 [4]. Η περιοχή που κωδικοποιεί τον ενεργό βρόγχο του αναστολέα της πρωτεάσης (Met358) εντοπίζεται εντός του εξονίου V. Μετά τη μεταγραφή, το mRNA της A1AT μεταφράζεται στα ριβοσώματα του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, παράγοντας μια πρωτεΐνη μήκους 418 αμινοξέων. Το πεπτιδικό σήμα των 24 αμινοξέων απομακρύνεται, καθώς η πρωτεΐνη κυκλοφορεί εντός του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, όπου γλυκοζυλιώνεται με την προσθήκη υδατανθράκων υψηλής περιεκτικότητας σε μανόζη και παίρνει την τελική της τρισδιάστατη μορφή στο χώρο. Η τελική ωρίμανση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται στο σύστημα Golgi κι έπειτα η πρωτεΐνη εκκρίνεται στην κυκλοφορία.



(Aleksandra Topic, Polymerization and Oxidation of Alpha-1-Antitrypsin in Pathogenesis of Emphysema)

Εικόνα 2 : Η δομή του γονιδίου SERPINA1 όπου φαίνονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης, το σήμα της πολυαδενυλίωσης και η θέση πρόσδεσης των υδατανθράκων.



Nature Reviews | Disease Primers

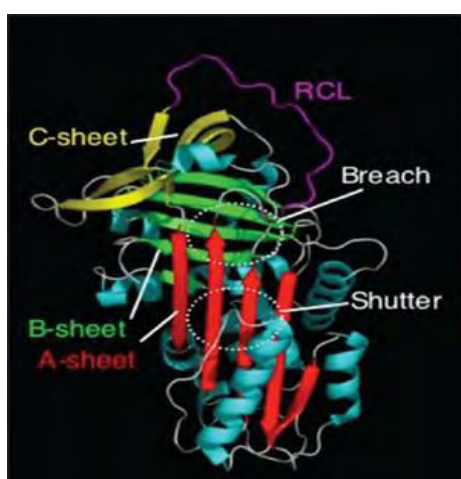
(EmerKelly, Alpha-1 antitrypsin deficiency Respiratory Medicine 2010)

Εικόνα 3 : Τα 3 μη κωδικά εξόνια και τα 4 εξόνια του γονιδίου SERPINA1. Τα 1A, 1B, 1C βρίσκονται στην 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR), ενώ τα εξόνια II, III, IV, V κωδικοποιούν την πρωτεΐνη A1 αντιθρυψίνη (A1AT). Ο υποκινητής εντός του εξωνίου 1C προάγει τη μετγραφή του γονιδίου στα ηπατοκύτταρα και ο υποκινητής που είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή στα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, εντοπίζεται εντός του εσόνιου 1A .

1.2 A1-ΑΝΤΙΘΡΥΨΙΝΗ

Η A1AT, που ονομάζεται επίσης αναστολέας άλφα-1-πρωτεάσης (PI), είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων πρωτεασών της σερίνης (σερίνες). Η A1AT ανευρίσκεται στους πνεύμονες, είτε μέσω διάχυσης από το ήπαρ- όπου κατεξοχήν παράγεται, διά της αιματικής κυκλοφορίας, είτε παράγεται από τα κυψελιδικά μακροφάγα και άλλα κύτταρα του βρογχικού επιθηλίου. Ο κύριος ρόλος της εντοπίζεται στην εξουδετέρωση της ελαστάσης των ουδετεροφίλων, προσφέροντας μείζονα προστασία έναντι της καταστροφικής δράσης αυτού του ενζύμου επί της ελαστίνης- κύριου δομικού συστατικού των κυψελίδων του πνεύμονα, κρατώντας σε ισορροπία τις συγκεντρώσεις πρωτεασών-αντιπρωτεασών. Αποτελείται από 394 αμινοξέα τα οποία οργανώνονται σε 3 β-φύλλα (A,B και C), 9α-έλικες (A έως I) και ένα ενεργό βρόγχο. (Εικόνα 4)

Η υπεύθυνη περιοχή της A1 αντιθρυψίνης για την αλληλεπίδραση με μια πρωτεάση-στόχο, είναι το RCL. Στην ενεργή μορφή της πρωτεΐνης ο βρόγχος προεξέχει από το κύριο τμήμα του μορίου και είναι έτοιμος να αλληλεπιδράσει με το ενεργό κέντρο μιας πρωτεάσης σερίνης. Ο βρόγχος αυτός κατευθύνει την πρόσδεση στην πρωτεάση-στόχο. Η πρωτεάση διασπά τη σερίνη, που υπάρχει στο RCL, δημιουργώντας ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ της καρβοξυλομάδας της σερίνης του RCL και της υδροξυλομάδας της σερίνης της πρωτεάσης. Το σύμπλοκο A1AT- πρωτεάσης, που προκύπτει είναι ανενεργό και πολύ σταθερό. Η πρωτεΐνη A1 αντιθρυψίνη ανιχνεύεται, επίσης, στα δάκρυα, το σάλιο, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, τις εκκρίσεις των πνευμόνων και το μητρικό γάλα. Επίσης, δρα ως πρωτεΐνη οξείας φάσης η οποία αυξάνεται κατά την παρουσία φλεγμονής, νεοπλασματικών ασθενειών και εγκυμοσύνης. Ωστόσο, σε ασθενείς που πάσχουν από έλλειψη α1 αντιθρυψίνης, οι παραπάνω καταστάσεις δεν επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης.



(Raghav Gupta, Ann Thorac Med. 2014 Jan-Mar; 9(1): 39–41)

Εικόνα 4 : Η τρισδιάστατη μορφή της πρωτεΐνης A1AT. Αριστερά φαίνονται τα 3 β-φύλλα (A,B,C), στη συνέχεια το ενεργό κέντρο-βρόγχος RCL και οι 9 α'-έλικες

1.3 AATD

Η έλλειψη της α1 αντιθρυψίνης (AATD) είναι μια διαταραχή η οποία εμφανίζει αυτοσωμικό συνεπικρατή τρόπο κληρονομής με συχνότητα 1 : 2,000 - 3,000 γεννήσεις . Επηρεάζει 3,4 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως κι έχει συσχετιστεί με την πρόωμη εμφάνιση εμφυσήματος και ηπατικών νόσων, όπως η κίρρωση του ήπατος .Το γονίδιο που την κωδικοποιεί – *SERPINA1*- έχει βρεθεί πως είναι εξαιρετικά πολυμορφικό και οι μεταλλάξεις οι οποίες ανιχνεύονται, καθιστούν την πρωτεΐνη ευάλωτη σε αλλαγές που αφορούν τη διαμόρφωσή της και ευθύνονται για την εκδήλωση της AATD.

Διακρίνονται 4 κατηγορίες που αφορούν στα επίπεδα και τη λειτουργία της A1AT στον άνθρωπο. Αυτές είναι : α) φυσιολογική A1AT (normal), β) ανεπάρκεια A1AT (deficient), γ) μηδενικά επίπεδα A1AT (null), δ) δυσλειτουργική A1AT (dysfunctional). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης ελέγχονται από ένα ζεύγος συνεπικρατών αλληλίων, ενώ έχουν περιγραφεί πάνω από 100 πολυμορφισμοί στο γονίδιο *SERPINA1*. Τα κύρια αλλήλια που συναντώνται είναι το M, το S και το Z.

1.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΛΛΗΛΙΑ ΤΗΣ A1AT

Το φυσιολογικό αλλήλιο της A1AT πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται από φυσιολογικά επίπεδα στο πλάσμα και λειτουργική δράση, όσον αφορά την αναστολή της ελαστάσης των ουδετεροφύλων. Πάνω από το 95% των παραλλαγών χαρακτηρίζονται ως M1 (Ala213), M1 (Val213) και M3. Μεταξύ των Καυκάσιων, η παραλλαγή M2 (Val213) είναι η πιο συνήθης, ενώ οι M1 και M3 παραλλαγές, συναντώνται λιγότερο. Τα πιο σπάνια αλλήλια, με συχνότητες εμφάνισης μικρότερες από 1% είναι οι M4, Balhambra, F, PStAlbans και XChirstchurch. Συνήθως, οι σπάνιες παραλλαγές παίρνουν το όνομά τους από τον τόπο γέννησης του μεγαλύτερου ηλικιακά ασθενή που έχει εξετασθεί. Τα Pi*M άτομα, χαρακτηρίζονται από φυσιολογικά επίπεδα A1AT στον ορό (20-50μM) και φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης.[5]

1.5 ΑΝΕΠΑΡΚΗ ΑΛΛΗΛΙΑ ΤΗΣ A1AT

Τα ανεπαρκή αλλήλια έχουν συσχετιστεί με χαμηλότερη επίπεδα A1AT στον ορό, σε σχέση με τα φυσιολογικά αλλήλια. Πλήθος μεταλλάξεων που σχετίζονται με την έλλειψη της A1AT, έχουν βρεθεί, με τα πιο κοινά παθολογικά αλληλόμορφα να είναι το S και το Z. Τα πιο σπάνια παθολογικά αλληλόμορφα, είναι τα MMalton, MMineralSprings, MNichinan, MProcida, PLowell, SIiyama, κ.ά. Μελέτες χαρτογράφησης έχουν

δείξει πως ο Pi*Z απλότυπος εμφανίστηκε αρχικά στη Βόρεια Ευρώπη.[6] Δεδομένα δείχνουν πως οι παραλλαγές της A1AT πρωτεΐνης βασίστηκαν σε μικροδορυφορική αστάθεια, προτείνοντας πως η Z παραλλαγή εμφανίστηκε περίπου 107 με 135 γενιές πριν, κατά την Νεολιθική εποχή. Η συχνότητα του Z αλληλίου δείχνει μια μεγάλη διακύμανση στους Καυκάσιους πληθυσμούς, ωστόσο συναντάται σπάνια στην Ασία και την Αφρική.[7][8] Ο Pi*S απλότυπος έχει ακόμη μεγαλύτερη ηλικία εμφάνισης-περίπου 279 με 470 γενιές - με αρχικό σημείο προέλευσης την Ιβηρική χερσόνησο.[9]

1.5.1 Z αλλήλιο

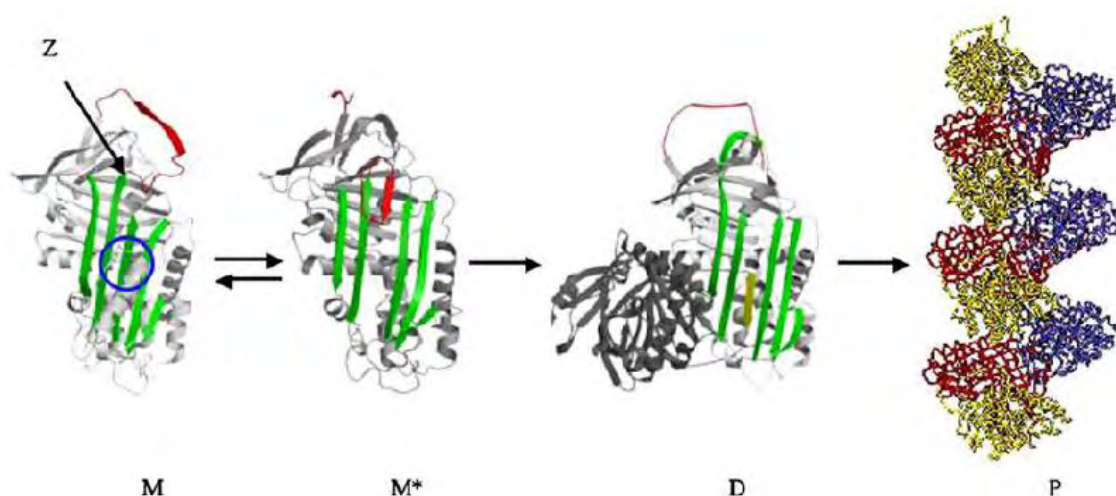
Το Z αλλήλιο, με συχνότητα εμφάνισης 1,4 – 1,5 % στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό, αποτελεί ένα από τα πιο κοινά παθολογικά αλληλόμορφα που προκύπτει από την παραλλαγή M1(Ala213) λόγω μιας σημειακής αντικατάστασης η οποία είναι η ίδια σε όλα τα άτομα που την φέρουν. Το μοριακό ελάττωμα που εμφανίζει (E342K), είναι μια υποκατάσταση ενός **GAG** που κωδικοποιεί ένα γλουταμινικό οξύ (**Glu342**) από ένα **AAG** που κωδικοποιεί μια λυσίνη (**Lys342**).[10][11] Η Z μετάλλαξη διαταράσσει τη δομή της πρωτεΐνης, επεμβαίνοντας στην αλληλεπίδραση μεταξύ του ενεργού βρόγχου και του Α β-φύλλου, με συνέπεια τη διατάραξη της τεταρτοταγούς δομής της. Ως αποτέλεσμα, το Α β-φύλλο ανοίγει και δημιουργείται ένα ασταθές ενδιάμεσο μόριο M* (Εικόνα 5) . Στη συνέχεια, το Α β-φύλλο αλληλεπιδρά με τον ενεργό βρόγχο ενός άλλου A1AT μορίου, προκειμένου να σχηματιστεί ένα διμερές (D), το οποίο επεκτείνεται για να δημιουργήσει αλυσίδες πολυμερών (P).[12] Η διαδικασία του πολυμερισμού εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση, όσο και από τη θερμοκρασία. Ανωμαλίες στις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης προκαλούν τη συσσώρευση πολυμερών A1AT στον αυλό του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων της στον ορό. Η παθολογική πρωτεΐνη συσσωρεύεται στα ηπατοκύτταρα με τη μορφή έγκλειστων μορίων, τα οποία είναι θετικά στη χρώση Schiff (PAS-D) και ορατά σε μικροσκοπία. Τα πολυμερή της A1AT, είναι τοξικά για τα ηπατοκύτταρα και προκαλούν ηπατική νοσολογία, με πιο συχνά φαινόμενα την κίρρωση του ήπατος σε πρώιμες ηλικίες και τον καρκίνο του ήπατος στους ενήλικες. [13] Ως συνέπεια αυτής της συσσώρευσης, τα ηπατοκύτταρα των ομόζυγων Pi*ZZ και των ετερόζυγων Pi*MZ ασθενών, εκκρίνουν περίπου 85-90 % και 50%, αντίστοιχα, λιγότερη πρωτεΐνη σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα. Εκτός αυτού, η Z παθολογική πρωτεΐνη είναι λιγότερο αποτελεσματική στην αναστολή της ουδετεροφιλικής ελαστάσης.[14] Συνεπώς, στα Pi*ZZ άτομα, η ελατωματική A1AT και τα μειωμένα της επίπεδα οδηγούν σε πρώιμη εμφάνιση εμφυσήματος, ΧΑΠ και βρογχεκτασιών. Παρόμοια εμφάνιση πολυμερών, ηπατικών, έγκλειστων μορίων, με ταυτόχρονη απουσία πρωτεΐνης από το πλάσμα, παρατηρείται και σε άλλες 2 παραλλαγές – στην MMalton (Phe52 deleted)[15] και στη Sliyama (Ser → Phe) [15]– οι οποίες συναντώνται συχνά στη Σαρδηνία και την Ιαπωνία, αντίστοιχα. Πολυμερή της A1AT, επίσης, ανιχνεύθηκαν σε BALF ομοζυγωτών Pi*Z με κλινική εικόνα εμφυσήματος. Αυτή η στερεοδιαμορφωτική

αλλαγή, μειώνει τα λειτουργικά επίπεδα του αναστολέα πρωτεάσης στον πνεύμονα, με συνέπεια την ιστική καταστροφή του.[16]

Μελέτες έχουν δείξει πως η παθολογική Z A1AT εντοπίζεται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα και πως τα πολυμερή αυτά, παράγουν κυταροκίνες που επάγουν την απόπτωση και τη φλεγμονή.[17][18] Δεδομένα από μελέτες δείχνουν πως ακόμη και τα ομόζυγα Pi^*Z άτομα, με οριακά φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία, εμφανίζουν υψηλή συγκέντρωση σε ουδετερόφιλα στην επιθηλιακή επιφάνεια της αναπνευστικής οδού.[19]

Μια πρόσφατη έρευνα, πρότεινε ένα πιθανό τρόπο με τον οποίο η Z μεταλλαγή μπορεί να εμπλέκεται στην απόκριση του οργανισμού σε μια μόλυνση.[20] Στην περίπτωση εισβολής παθογόνων μικροβίων, ο οργανισμός αποκρίνεται με φλεγμονώδεις αντιδράσεις, που έχουν ως αποτέλεσμα την έκκριση αυξημένων επιπέδων Z A1AT από τα ηπατοκύτταρα, η οποία λειτουργεί ως πρωτεΐνη οξείας φάσης. Παράγοντες όπως η θερμοκρασία, οι υψηλές συγκεντρώσεις μεταλλαγμένης Z A1AT πρωτεΐνης και το χαμηλό pH στο σημείο της βακτηριακής μόλυνσης, ενισχύουν τον πολυμερισμό της παθολογικής Z πρωτεΐνης.[21] Τα πολυμερή, διαθέτουν χημειοτακτικές ιδιότητες που εντείνουν τη διαδικασία της φλεγμονής και την επιπλέον στρατολόγηση ουδετερόφιλων στο σημείο.

Μια θεραπευτική προσέγγιση στην αντιμετώπιση της έλλειψης της A1AT, θα ήταν η αναστολή του πολυμερισμού της Z πρωτεΐνης- εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά- σε συνδιασμό με κάποια θεραπευτική αγωγή. Είναι σαφές πως η εξωγενής χορήγηση μη πολυμερούς A1AT πρωτεΐνης, προκειμένου να αντισταθμιστεί η έλλειψή της από τον ορό, θα έφερε βελτίωση στην εικόνα της ηπατικής νόσου, καθώς επίσης και στην προστασία της αναπνευστικής οδού από την καταστροφική δράση της ελαστάσης. Αυτή τη στιγμή βρίσκεται σε εξέλιξη η δημιουργία ενός συνθετικού πεπτιδίου που αναστέλλει εκλεκτικά τον πολυμερισμό της Z πρωτεΐνης. [22][23][24][25]



Εικόνα 5: Σχηματισμός πολυμερών Z (Lomas, 2005)

1.5.2 S αλλήλιο

Σε αντίθεση με το Z αλλήλιο, η S παραλλαγή προκαλεί μόνο απουσία της πρωτεΐνης από τον ορό. Ο απλότυπος Pi^*S προκύπτει από την M1(Val213) παραλλαγή λόγω μιας σημειακής μετάλλαξης ($GAA \rightarrow GTA$) που έχει ως συνέπεια την αντικατάσταση ενός γλουταμινικού οξέος από μια βαλίνη στο εξόνιο 3, στη θέση 264 (E264V).[26] Η παραλλαγή S, ευνοεί τη διαδικασία πολυμερισμού της πρωτεΐνης A1AT – η οποία λαμβάνει χώρα με πιο ήπιο ρυθμό σε σχέση με την παραλλαγή Z- χωρίς να επηρεάζει την ικανότητά της να αναστέλλει την ελασάση των ουδετεροφύλων.[27] Ο αργός ρυθμός με τον οποίο συμβαίνει ο πολυμερισμός, προκαλεί λιγότερη συσσώρευση της S παραλλαγμένης A1AT στο ήπαρ, και μειώνει τα επίπεδα της στον ορό κατά 60 %. Επίσης, οι φορείς του S απλότυπου ($PiSS$, $PiSZ$, $PiMS$) εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης στον ορό της τάξης του 48%, 32%, 25%, αντίστοιχα, σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα. Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός πως, οι ασθενείς με $PiSZ$ απλότυπο, έχει βρεθεί πως πάσχουν από κίρρωση του ήπατος, [28] [28] – γεγονός που εξηγείται από την αλληλεπίδραση ετεροπολυμερών πρωτεΐνης S και Z. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς, στην περίπτωση που αποτελούν χρόνιους καπνιστές, έχουν μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης ΧΑΠ, σε αντίθεση με αυτούς που δεν είναι χρόνιοι καπνιστές και φέρουν ελάχιστη έως καθόλου προδιάθεση για την εμφάνιση ΧΑΠ. [29]

1.6 ΜΗΔΕΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ A1AT

Τα μηδενικά αλλήλια, χαρακτηρίζονται από μια τροποποίηση σε μια σημαντική περιοχή του γονιδίου κατά την οποία δεν παράγεται mRNA. Παρότι αρκετά σπάνια, έχουν παρατηρηθεί σε πολλούς πληθυσμούς. Η συχνότητα τους στον Καυκάσιο πληθυσμό έχει υπολογιστεί να είναι μικρότερη από 0.1% . Αυτού του είδους τα αλληλόμορφα χαρακτηρίζονται ως Q0, αντί για Pi . Οι μηδενικές (null) μεταλλάξεις, δεν έχουν αντίκτυπο στην παραγόμενη πρωτεΐνη, ούτε συμβάλλουν με κάποιο τρόπο στη δημιουργία πολυμερών μορίων. Τα άτομα που φέρουν τέτοιες μεταλλάξεις, εμφανίζουν μειωμένη αναπνευστική λειτουργία σε σχέση με άτομα γονότυπου Pi^*SZ και Pi^*ZZ και χαρακτηρίζονται από αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης εμφυσήματος.[30] Η έγκαιρη ανίχνευση των μηδενικών μεταλλάξεων είναι πολύ σημαντική τόσο για προγνωστικές, όσο και για θεραπευτικές παρεμβάσεις. Το $PiNull$ Bellingham αλλήλιο διαφέρει από το φυσιολογικό M1 (Val213) αλλήλιο, λόγω μιας μετάλλαξης στο εξόνιο II, όπου το κωδικόνιο που κωδικοποιεί το αμινοξύ Lys217 (AAG) μετατρέπεται σε κωδικόνιο λήξης (TAG).[10] Τα ομόζυγα άτομα για το $PiNull$ Bellingham αλλήλιο, χαρακτηρίζονται από πλήρη απουσία A1AT πρωτεΐνης και από πρόωμη εμφάνιση εμφυσήματος σε σύγκριση με ομόζυγα άτομα Pi^*ZZ . Το Nullisola di procida αλλήλιο προκύπτει λόγω μιας έλλειψης στα εξόνια II και V του γονιδίου SERPINA1.[31] Η Nullgranite μεταλλαγή προκύπτει από το M1 αλλήλιο (Ala213) λόγω της διαγραφής μιας βάσης στο εξόνιο II, στο κωδικόνιο που κωδικοποιεί

μια τυροσίνη (Tyr160) (TAC).[32] Η διαγραφή του C, προκαλεί μετατόπιση πλαισίου στο 5' άκρο καθοδικά των νουκλεοτιδίων, μετακινώντας το G στην επόμενη τριπλέτα κωδικονίων προκειμένου να σχηματιστεί GTC (Val161) αντί για το αναμενόμενο Tyr160. Το Nullmattawa αλληλίο είναι αποτέλεσμα μιας προσθήκης ενός νουκλεοτιδίου εντός της κωδικής περιοχής του εξονίου V, προκαλώντας μια μετατόπιση πλαισίου του 3' άκρου, με συνέπεια τη δημιουργία ενός πρόωρου σήματος λήξης της μεταγραφής.[33] Κατόπιν γονοτύπησης της κωδικής περιοχής του γονιδίου SERPINA1, ανακαλύφθηκαν ακόμη 2 null μεταλλάξεις – οι Q0soest και Q0amersfoort – και βρέθηκε πως οι ασθενείς που τις έφεραν, χαρακτηρίζονταν από επίπεδα A1AT πρωτεΐνης ≤ 1.0 g/L στο πλάσμα.[34]

1.7 ΗΠΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Είναι πλέον αποδεκτό πως η ηπατική δυσλειτουργία που προκαλεί η εμφάνιση της Z παραλλαγής, συμβαίνει λόγω της συσσώρευσης της μη φυσιολογικής πρωτεΐνης με τη μορφή έγκλειστων μορίων και δεν οφείλεται σε ανεπάρκεια παραγωγής αυτής. Τα ευρήματα αυτά, ενισχύονται από την παρατήρηση ότι, άτομα που φέρουν αλληλίο που οδηγούν σε πλήρη ανεπάρκεια της A1AT δεν εμφανίζουν ηπατική νοσολογία.[19] Επιπλέον, έχει βρεθεί από μελέτες που έχουν γίνει σε διαγονιδιακά ποντίκια, πως αυτά που είναι ομόζυγα για το Pi*Z, εμφανίζουν ηπατική νόσο. [35][36]

Η αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης στην οποία υπόκειται η φυσιολογική πρωτεΐνη, προκειμένου να αναστείλει την πρωτεάση-στόχο της την ελαστάση των ουδετεροφίλων- συνιστά τη μοριακή βάση της έλλειψης της A1AT. Η Z παραλλαγή εντοπίζεται στο κατάλοιπο P17, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα στην κορυφή του 5-κλώνου ενός β-φύλλου A και της βάσης του RCL. Η μετάλλαξη ανοίγει το β-φύλλο A, ευνοώντας έτσι την εισαγωγή του ενεργού βρόγχου ενός άλλου μορίου A1AT, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα διμερές.[12] Αυτό το διμερές επεκτείνεται και σχηματίζονται πολυμερή που συσσωρεύονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο του ηπατοκυττάρου με τη μορφή έγκλειστων μορίων. [37] (Εικόνα 5) Ο ρυθμός του πολυμερισμού μπορεί να επιταχυνθεί με μια αύξηση της θερμοκρασίας στους 41°C. Ωστόσο, η διαδικασία μπορεί να ανασταλεί πλήρως, με την εισαγωγή πεπτιδίων τα οποία ανταγωνίζονται με τον ενεργό βρόγχο RCL, για τη σύνδεση με ένα A β-φύλλο. Ο ρόλος που διαδραματίζει ο πολυμερισμός της πρωτεΐνης A1AT in vivo, έχει αποσαφηνιστεί, αφενός, μέσα από την παρουσία έγκλειστων πολυμερών της πρωτεΐνης στο ήπαρ διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν σε ομοζυγωτία την Z παραλλαγή κι εμφανίζουν κίρρωση του ήπατος.[12] Τα τελευταία δεδομένα, υποστηρίζουν πως η Z παραλλαγή αναγκάζει την πρωτεΐνη A1AT να μεταβεί σε μια διαμορφωτική αλλαγή που προσεγγίζει το ασταθές M * μόριο κι επομένως ευνοεί τον σχηματισμό πολυμερών.[38] Οι μηχανισμοί που διενεργούν ποιοτικό έλεγχο εντός των ηπατοκυττάρων και διαχειρίζονται την παρουσία των πολυμερών, βρίσκονται υπό διερεύνηση.[39][40][41] Ωστόσο, παρά

την λεπτομερή μελέτη της εναπόθεσης των πολυμερών ως έγκλειστα, παραμένει ασαφές πώς η συσσώρευση της παραλλαγμένης Z A1AT εντός των ηπατοκυττάρων, προκαλεί κυτταρικό θάνατο και κίρρωση του ήπατος. Η εξάρτηση από την θερμοκρασία και την συγκέντρωση του πολυμερισμού,[12][27] μαζί με τους γενετικούς παράγοντες [42], μπορεί να αντιπροσωπεύει την ετερογένεια της ηπατικής νόσου μεταξύ των ατόμων που είναι ομόζυγα για τη μετάλλαξη Z. Το επίπεδο σύνθεσης α1-αντιθρυψίνης αυξάνεται κατά τη διάρκεια επεισοδίων φλεγμονής, ως μέρος της απόκρισης οξείας φάσης.[43]

Παρά το γεγονός πως έχουν περιγραφεί πολλές μεταλλάξεις που προκαλούν έλλειψη α1 αντιθρυψίνης, μόνο 2 παραλλαγές έχουν συσχετιστεί ταυτόχρονα, τόσο με απουσία της πρωτεΐνης από το πλάσμα, όσο και με την ηπατική της συσσώρευση. Αυτές είναι οι εξής : Siiyama (Ser53Phe) και Mmalton (52Phe deleted). Η Siiyama παραλλαγή, αποτελεί την πιο σοβαρή μετάλλαξη που προκαλεί AATD στην Ιαπωνία, ενώ η Mmalton παραλλαγή (γνωστή και ως Mnichinan και Mcgliari) αποτελεί το συχνότερο αίτιο πρόκλησης AATD στη Σαρδηνία. Η εμφάνιση και των 2 μεταλλάξεων προκύπτει κατά την αλληλεπίδραση του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης A1AT με την πρωτεάση-στόχο της. Οι 2 μεταλλάξεις αποσταθεροποιούν το σύμπλεγμα που δημιουργείται και ανοίγουν το Α β-φύλλο επιτρέποντας τη δημιουργία πολυμερών in vivo. Πρόσφατες μελέτες, δείχνουν ότι ο πολυμερισμός της πρωτεΐνης ευθύνεται και για την ήπια απουσία της από το πλάσμα, όταν εμφανίζεται η παραλλαγή S (Glu264Val) και I (Arg39Cys). [27][43] Οι σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν την εμφάνιση των παραπάνω απλοτύπων, έχουν μικρότερη επίδραση στο Α β-φύλλο σε σύγκριση με αυτή που επιφέρει η παραλλαγή Z. Ακόμη, ο ρυθμός με τον οποίο λαμβάνει χώρα ο πολυμερισμός στην πρωτεΐνη που παράγεται όταν συναντώνται οι προηγούμενες μεταλλάξεις, είναι πολύ πιο αργός σε σχέση με αυτόν μιας παραλλαγμένης Z – πρωτεΐνης – γεγονός το οποίο οδηγεί σε μικρότερη συγκέντρωση A1AT εντός των ηπατοκυττάρων, πιο ήπια απουσία της από το πλάσμα κι έλλειψη εμφάνισης του κλινικού φαινοτύπου της νόσου.[44] Ωστόσο, στην περίπτωση όπου μια I ή S μεταλλαγή (ήπιος ρυθμός πολυμερισμού) συγκληρονομηθεί με μια Z μεταλλαγή (ταχύς ρυθμός πολυμερισμού), έπειτα από αλληλεπίδραση μεταξύ τους, σχηματίζονται ετεροπολυμερή εντός των ηπατοκυττάρων με αποτέλεσμα την εμφάνιση έγκλειστων μορίων και κατ' επέκταση κίρρωση του ήπατος. [27]

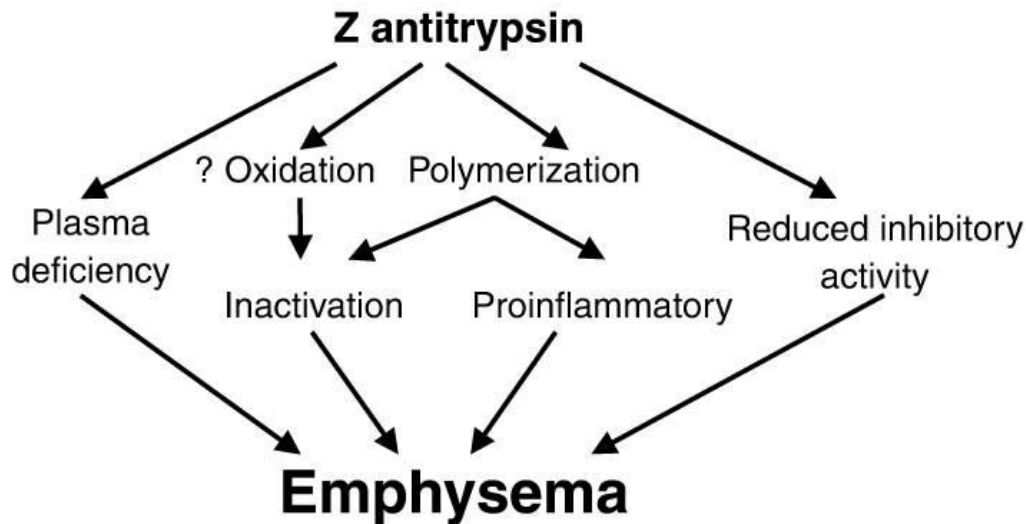
1.8 ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

Τα άτομα που πάσχουν από έλλειψη α1- αντιθρυψίνης είναι επιρρεπή στην πρόωμη εμφάνιση αναπνευστικών διαταραχών, όπως είναι το εμφύσημα, η χρόνια βρογχίτιδα, οι βρογχεκτασίες και το άσθμα. Οι ασθενείς αυτοί, συνήθως, παρουσιάζουν συμπτώματα δύσπνοιας, έντονου βήχα και πνευμονικών παροξύνσεων, χωρίς απαραίτητα να είναι χρόνιοι καπνιστές.[45] Τα συμπτώματα, συνήθως, ξεκινούν από

την ηλικία των 30 ετών και η κλινική υποψία για την παρουσία άσθματος ή ΧΑΠ παραπέμπει σε σπιρομετρική εξέταση.[45][46]

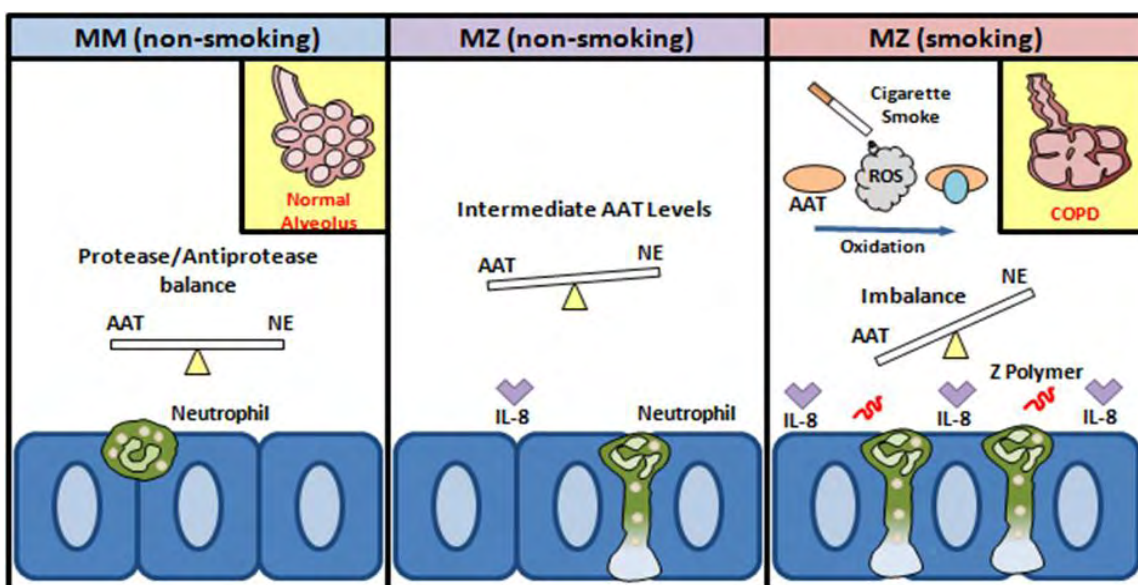
Πρόσφατα δεδομένα, συνδέουν την εμφάνιση αναπνευστικής νόσου, με την εμφάνιση της Z παραλλαγής σε ομοζυγωτία. Αφενός, η διαθέσιμη A1AT που φυσιολογικά θα προστάτευε την ανώτερη αναπνευστική οδό, είναι 5 περίπου φορές λιγότερο αποτελεσματική στην αναστολή της ελαστάσης, σε σύγκριση με την φυσιολογική.[14] Αφετέρου, από πρόσφατα δεδομένα προκύπτει πως, η Z μετάλλαξη, βρέθηκε υπεύθυνη για το σχηματισμό πολυμερών μορίων πρωτεΐνης, στο εσωτερικό των πνευμόνων.[16] Η συγκεκριμένη στερεοδιαμορφωτική μετάβαση, απενεργοποιεί την πρωτεΐνη, επιφέροντας ακόμη μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα της. Ο σχηματισμός αυτών των πολυμερών, μπορεί να επιταχυνθεί λόγω του φλεγμονώδους εσωτερικού του πνεύμονα ενός ατόμου που πάσχει από AATD Z αιτιολογίας. Επιπρόσθετα, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως ο πολυμερισμός συμβαίνει με ταχύτερο ρυθμό παρουσία χαμηλού pH.[44]

Η AATD Z αιτιολογίας εκθέτει τους πνεύμονες σε χρόνια και ανεξέλεγκτη πρωτεολυτική προσβολή λόγω της ανεπαρκούς αναστολής στη δραστηριότητα της πρωτεάσης σερίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την κυψελιδική καταστροφή σε πρώιμα ηλικιακά στάδια (<40 ετών), η οποία μπορεί να συμβεί ανεξαρτήτως περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου, όπως το κάπνισμα. Ωστόσο, το κάπνισμα αυξάνει σημαντικά τη συχνότητα και τη σοβαρότητα της ΧΑΠ, λόγω της οξειδωτικής και πρωτεολυτικής απενεργοποίησης των ήδη χαμηλών επιπέδων πρωτεΐνης. Η αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης μεσολαβείται από παράγωγα δραστικών ριζών οξυγόνου και από μεταλλοπρωτεάσες που απελευθερώνονται από τα μονοκύτταρα. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί πως η AATD εμπλέκεται στην παθογένεση της ΧΑΠ και με ακόμη έναν τρόπο. Η ATZ πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί ένα πολυμερές A1AT πρωτεϊνών, ελκύει χημειοτακτικούς παράγοντες των ουδετερόφιλων όπως είναι η IL-8 και το λευκοτριένιο B4 (LTB4), είτε λειτουργεί η ίδια άμεσα ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα ουδετερόφιλα και έχει διαπιστωθεί στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία των πνευμόνων.[47] Αυτές οι παρατηρήσεις ενισχύονται από δεδομένα που υποδεικνύουν ότι στην ΧΑΠ AATD αιτιολογίας, πραγματοποιείται υψηλότερος βαθμός διήθησης από ουδετερόφιλα, εντονότερες φλεγμονώδεις αντιδράσεις και κατ' επέκταση μεγαλύτερος βαθμός ιστικής βλάβης σε σχέση με τη ΧΑΠ άλλων αιτιολογιών.[48]



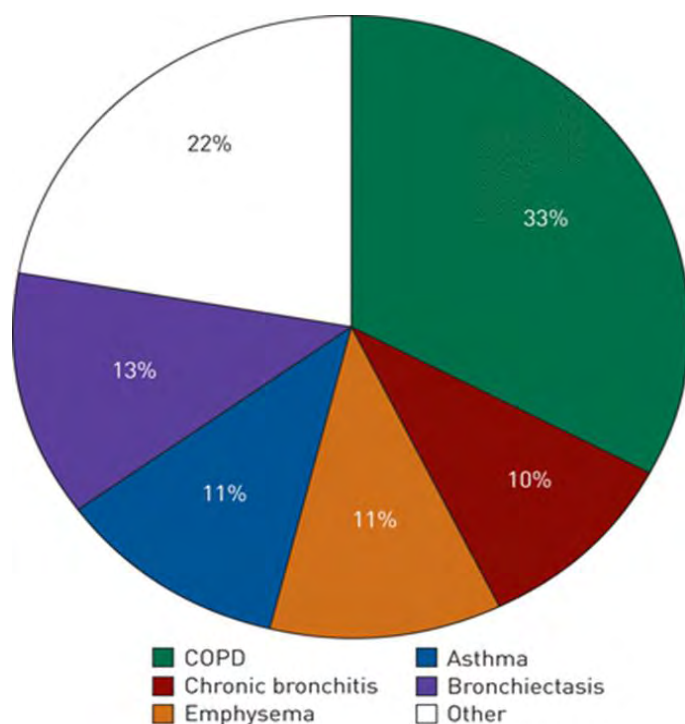
(D A Lomas, H Parfrey, Thorax. 2004)

Εικόνα 6 : Προτεινόμενο μοντέλο που περιγράφει την παθογένεση του εμφυσήματος σε ασθενείς με AATD (Z αιτιολογίας). Η απουσία της πρωτεΐνης από το πλάσμα και η μειωμένη ανασταλτική δράση της παθολογικής Z πρωτεΐνης, είναι δυνατό να οξύνεται από τον πολυμερισμό της A1AT στους πνεύμονες. Αυτές οι 2 καταστάσεις, απενεργοποιούν τη δράση του αναστολέα, μειώνονται περαιτέρω τα επίπεδα της αντιπρωτεϊνάσης. Τα πολυμερή της πρωτεΐνης μπορούν, επίσης, να αποτελέσουν ερέθισμα προκειμένου να προσελκύσουν επιπλέον ουδετερόφιλα, προκαλώντας μεγαλύτερη ιστική βλάβη. (Lomas DA, Parfrey H., Thorax 2004)



(Tomás P Carroll et al. Respir Res. 2011)

Εικόνα 7: Παθογένεση ΧΑΠ σε ετεροζυγώτες MZ. Μια φυσιολογική ισορροπία πρωτεασών/αντιπρωτεασών περιγράφεται στο αριστερό μέρος. Οι μη καπνιστές που φέρουν γονότυπο MZ, εμφανίζουν μέτρια επίπεδα A1AT, αυξημένα επίπεδα IL-8 και ουδετερόφιλων (μεσαίο μέρος). Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου, απενεργοποιούν την πρωτεΐνη A1AT, οδηγώντας σε ανισορροπία πρωτεασών/αντιπρωτεασών στον οργανισμό. Ο πολυμερισμός της Z παθολογικής πρωτεΐνης, καθώς επίσης και τα υψηλά επίπεδα IL-8, αυξάνουν την εισροή των ουδετερόφιλων στο εσωτερικό του πνεύμονα ενός ατόμου με γονότυπο MZ. Μια συντριπτική αντιπρωτεασική ‘άμυνα’, συμβάλλει στην εμφάνιση ΧΑΠ.



(Chorostowska-Wynimko J, Eur Respir Rev. 2015)

Εικόνα 8: Κλινικές εκδηλώσεις ασθενών που φέρουν σε ομοζυγωτία το γονότυπο Pi*ZZ που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια μιας ανάλυσης που διενεργήθηκε στην Πολωνία (2010 έως Ιούνιος 2014). Η ΧΑΠ αποτελεί τη συχνότερη διάγνωση.

1.9 ΑΑΤΔ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Η ΑΑΤΔ αποτελεί ένα αρκετά υποδιαγεγνωσμένο νόσημα, που παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά τις κλινικές της εκδηλώσεις. Έχει συσχετιστεί με ηπατικές διαταραχές (χρόνια ηπατίτιδα, κίρρωση) [13][49], δερματικές ασθένειες (πανικουλίτιδα)[50], με την κοκκιωματώδη νόσο [51] [52][53], με την κοιλιοκάκη[54], με καρκίνους στον πνεύμονα και το έντερο [55], με ανευρύσματα στον εγκέφαλο[56], με την ινομυική δυσπλασία [57] και την παγκρεατίτιδα [58], καθιστώντας εμφανές το γεγονός ότι ο αναστολέας

πρωτεάσης, διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθοφυσιολογία αυτών των νοσημάτων.[59] Επίσης, η AATD επιτρέπει σε πρωτεολυτικά ένζυμα να προκαλέσουν την ιστική καταστροφή του πνεύμονα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση εμφυσήματος, το οποίο οδηγεί σε βρογχεκτασίες. [60]

1.10 AATD ΚΑΙ CVID

Οι βρογχεκτασίες εμφανίζονται πολύ συχνά στον κλινικό φαινότυπο των ασθενών που πάσχουν από CVID, αποτελώντας συνέπεια των υποτροπιάζουσων και χρόνιων βακτηριακών λοιμώξεων που πλήττουν την αναπνευστική οδό.[60] Οι ασθενείς αυτοί, εκτός από τις λοιμώξεις, εμφανίζουν συχνά υπερπλασίες (λεμφουπερπλασίες, σπληνομεγαλία) [61], αυτοάνοσες εκδηλώσεις[61] και κοκκιωματώδη νόσο [62]. Έχουν γίνει προσπάθειες, προκειμένου να κατηγοριοποιηθεί το νόσημα με βάση τις κλινικές του εκδηλώσεις, ωστόσο, έχει βρεθεί πως οι *in vitro* ανοσολογικές απαντήσεις φαίνεται να βοηθάνε σε αυτή την κατηγοριοποίηση.[63][64][65]

Η AATD, έχει αναφερθεί σε 2 ασθενείς που πάσχουν από CVID [66][67] και υπάρχει μια μόνο μελέτη στη βιβλιογραφία που εστιάζει στην ανίχνευση των S και Z παθολογικών αλληλόμορφων σε ασθενείς με CVID, επιχειρώντας να συσχετίσει τη διακύμανση της αναπνευστικής νόσου που παρατηρείται στη CVID, με την AATD.[60]

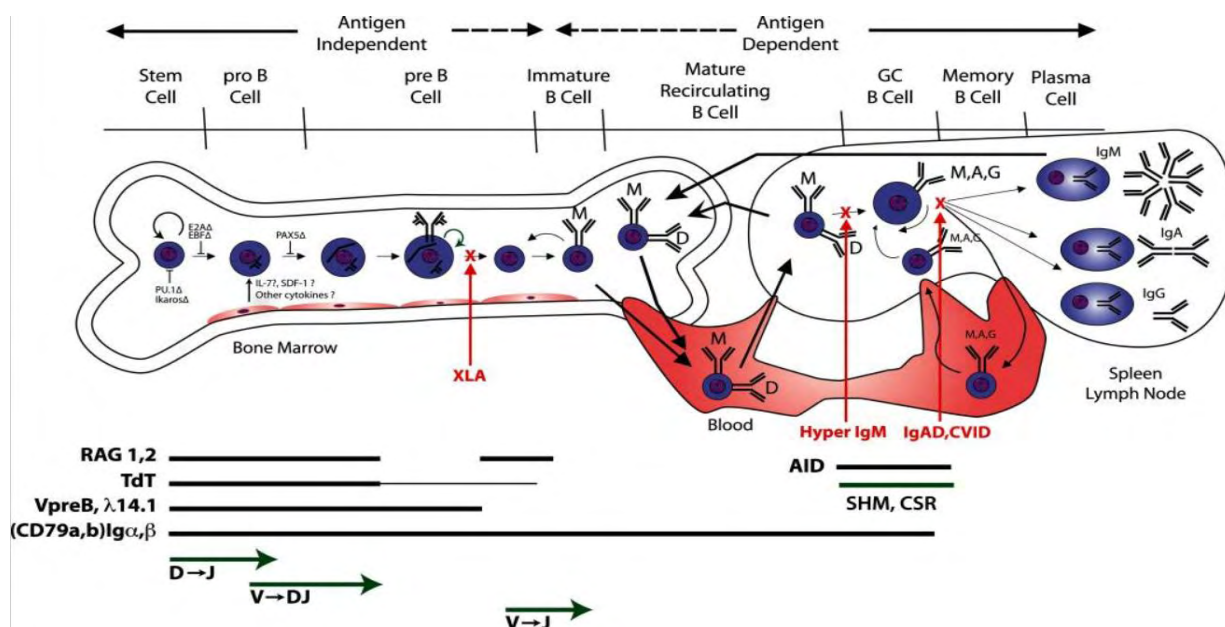
Στα αποτελέσματα της μελέτης, συμπεριλαμβάνεται μια αυξημένη κατανομή του Z αλληλόμορφου στους ασθενείς με CVID που εμφάνιζαν βρογχεκτασίες, σε σύγκριση με εκείνους που δεν τις εμφάνιζαν στην κλινική τους εικόνα. Επίσης, υποστηρίζει πως τόσο η AATD, όσο και η υπογαμμασφαιριναιμία, διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της αναπνευστικής νόσου στη CVID.

2.ΠΡΩΤΟΠΑΘΕΙΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ

2.1 PADs

Οι Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες δεν θεωρούνται πλέον σπάνια νοσήματα. Με τις μισές περίπου από αυτές να διαγιγνώσκονται κατά την ενήλικη ζωή, με μέση καθυστέρηση περί τα 5 έτη και με διάμεση ηλικία θανάτου των ασθενών >50ό έτος της ζωής, αντιπροσωπεύουν ένα κοινό πρόβλημα της Παθολογίας. Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα διαταραχών, οι οποίες διακρίνονται για την αδυναμία παραγωγής μιας αποτελεσματικής αντισωματικής απάντησης έναντι ενός παθογόνου. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών με PADs που έχει ανάγκη ιατρικής φροντίδας κατά την ενήλικη ζωή, πάσχουν από Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια. Οι περισσότερες PADs έχουν συσχετιστεί με απλές μεταλλάξεις γονιδίων που προκαλούν

ανωμαλίες στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των Β-κυττάρων (Εικόνα 1). Ωστόσο, ορισμένες μπορεί να οφείλονται στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων σε γενετικά ευπαθή άτομα, ενώ άλλες αποδίδονται στην καθυστερημένη ανοσιακή ωρίμανση.[68]



(Vale AM, Schroeder HW. Clinical Consequences of Defects in B cell Development. The Journal of allergy and clinical immunology. 2010;125(4):778-787. doi:10.1016/j.jaci.2010.02.018.)

Εικόνα 1 : B-κυτταρική ανάπτυξη και μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντισωματικές ανεπάρκειες. Ανωμαλίες στα μονοπάτια της B-κυτταρικής σηματοδότησης που μεσολαβούνται από την Btk και την πρωτεΐνη προσαρμογέα BLNK οδηγούν σε αναστολή της ανάπτυξης στο προ-προ-B-κυτταρικό στάδιο, προτείνοντας ότι η συναρμολόγηση ενός λειτουργικού προ-B-κυτταρικού υποδοχέα είναι κρίσιμη για τη μετάβαση από το προ-B-κύτταρο στο άωρο B-κύτταρο. Ωριμα B-κύτταρα υφίστανται μεταστροφή τάξης και σωματική υπερμετάλλαξη των γονιδίων των μεταβλητών περιοχών τους προκειμένου να αυξήσουν τη συγγένεια του υποδοχέα και τη διαφοροποίηση σε μνημονικά B-κύτταρα ή πλασματοκύτταρα. Ανωμαλίες σε αυτές τις όψιμες διαδικασίες της B-κυτταρικής διαφοροποίησης οδηγούν στις IgAD και CVID, αν και δεν γνωστή η ακριβής μοριακή βάση αυτών των αντισωματικών ανεπαρκειών.

2.1.1 Κλινικές Εκδηλώσεις των PADs

Βασικό χαρακτηριστικό της κλινικής εικόνας των PADs, είναι η ευαισθησία στις μικροβιακές κυρίως λοιμώξεις (πίνακες 2, 3). Οι βαριές, υποτροπιάζουσες και χρόνιες λοιμώξεις, αλλά και αυτές που

προκαλούνται από ασυνήθη παθογόνα, απαιτούν συχνή ή παρατεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών, καθώς επίσης και εκείνες που προκαλούν βλάβες ή δυσλειτουργία των προσβαλλόμενων οργάνων, πρέπει να εγείρουν την υποψία υποκείμενης PAD. Συχνότερες, είναι οι λοιμώξεις του ανώτερου και του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος από πυογόνα μικρόβια, με συνηθέστερα τον *Streptococcus pneumoniae* και τον *Haemophilus influenza* και σπανιότερα τα *Staphylococcus spp*, τα *Pseudomonas spp* και τη *Salmonella*. [69] Οι ιογενείς λοιμώξεις δεν αποτελούν γνώρισμα των PADs, ιδιαίτερα στους ενήλικες. Οι μισοί από τους ασθενείς με COVID έχουν ιστορικό ενός τουλάχιστον επεισοδίου πνευμονίας, ενώ οι υπόλοιποι παρουσιάζουν υποτροπιάζουσα βρογχίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα ή και μέση πυώδη ωτίτιδα, οι οποίες οδηγούν συχνά στην εμφάνιση επιπλοκών, όπως οι βρογχεκτασίες, η ΧΑΠ, το εμπύημα του θώρακα και η μαστοειδίτιδα. Στους ενήλικες, πολύ συχνά, οι PADs διαγιγνώσκονται από τις επιπλοκές μακροχρόνιων υποτροπιάζουσών λοιμώξεων (π.χ. βρογχεκτασίες), το αίτιο των οποίων δεν είχε αναγνωριστεί έγκαιρα. [70]

Πίνακας 1. Κατά συστήματα παρουσίαση των εκδηλώσεων και των επιπλοκών των PADs.

Εκδηλώσεις από το αναπνευστικό σύστημα (συχνότερες εκδηλώσεις)

- Λεμφοκυτταρικές ή κοκκιοματώδεις πνευμονικές διηθήσεις (10%)
- Βρογχεκτασίες και πάχυνση του τοιχώματος των βρόγχων (17–76%)

Εκδηλώσεις από το πεπτικό σύστημα

- Χρόνια διάρροια (40–60%)
- Διάρροια λοιμώδους αιτιολογίας (5–32%)
- Ατροφία των εντερικών θηλών (2,5%)
- Κοκκιώματα μπορεί να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε σημείο του πεπτικού σωλήνα
- Οξώδης λεμφική υπερπλασία (0,5–30%)

Ηπατικές εκδηλώσεις

- Η λοιμώδης ηπατίτιδα είναι σπάνια. Οι διαταραχές των δοκιμασιών της ηπατικής λειτουργίας οφείλονται συνήθως στην οξώδη αναγεννητική υπερπλασία (nodular regenerative hyperplasia) της COVID
- Πρωτοπαθής χολική κίρρωση
- Η σκληρυντική χολαγγειίτιδα αποτελεί ασυνήθη επιπλοκή, ιδίως μετά από λοίμωξη με κρυπτοσπορίδια

Αιματολογικές εκδηλώσεις (30%)

- Αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία, σύνδρομο Evans και ουδετεροπενία (2,5–11%)

Κακοήθη νοσήματα

- Αύξηση του σχετικού κινδύνου $\times 1,8$ –13.
- Συνηθέστερα είναι τα λεμφώματα ενώ επιθηλιακοί όγκοι εμφανίζονται σπανιότερα

Νευρολογικές εκδηλώσεις

- Οι λοιμώξεις από βακτήρια που φέρουν κάψα είναι το συνηθέστερο. Οι λοιμώξεις από βακτήρια που φέρουν κάψα είναι το συνηθέστερο αίτιο μηνιγγίτιδας
- Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα από εντεροϊούς
- Ανεξήγητη νευροεκφυλιστική νόσος μπορεί να εμφανιστεί, παρά τη θεραπεία με ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες – μερικά από τα σημεία της πιθανόν να μιμούνται την ανεπάρκεια της βιταμίνης E

Ρευματολογικές εκδηλώσεις

- Μη ειδική αρθρίτιδα, λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων
- Η συσχέτιση με αυτοάνοσης αιτιολογίας νοσήματα του συνδετικού ιστού είναι σπάνια

Δερματικές εκδηλώσεις

- Λοιμώξεις
- Κοκκιώματα

(Μ.Γ. Σπελέτας, Α. Γερμενής, Αρχεία ελληνικής Ιατρικής 2013)

Πίνακας 2. Οι λοιμώξεις με τις οποίες εμφανίζονται οι ασθενείς με PADs.

Εντόπιση (%)	Συχνότητα
Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος	37-90%
Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις των παραρρίνιων κόλπων	19-98%
Λοιμώξεις του πεπτικού συστήματος	6-38%
Δερματικές λοιμώξεις	1-13%
Λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος/ Μηνιγγίτιδα	2-9%
Άσηπτη αρθρίτιδα/οστεομυελίτιδα	1-7%
Οφθαλμικές λοιμώξεις	1,4-10%

(Μ.Γ. Σπελέτας, Α. Γερμενής, Αρχεία ελληνικής Ιατρικής 2013)

Πίνακας 3. Τα συνηθέστερα αίτια λοιμώξεων στους ασθενείς με PADs.

Λοιμώξεις	Παθογόνα
Λοιμώξεις των παραρρίνιων κόλπων και του αναπνευστικού συστήματος	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Σηπτική αρθρίτιδα	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma spp</i>
Λοιμώξεις του ουροποιογεννητικού συστήματος	<i>Ureaplasma spp</i>
Μηνιγγίτιδα	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>
Λοιμώξεις του πεπτικού συστήματος	<i>Cryptosporidium spp</i> , <i>Giardia spp</i> , <i>Campylobacter spp</i>
Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα	Εντεροϊοί

(Μ.Γ. Σπελέτας, Α. Γερμενής, Αρχεία ελληνικής Ιατρικής 2013)

2.1.2 Διάγνωση

Στην κλινική πράξη, τα βασικά προβλήματα σε σχέση με τη διαγνωστική των PADs είναι δύο. Το πρώτο, αφορά στον αποκλεισμό των δευτερογενών αιτιών της υπογαμμασφαιριναιμίας και το δεύτερο, στην αναζήτηση της διάγνωσης της CVID (δευτερευόντως και των υπολοίπων PADs) σε ασθενείς που εμφανίζουν τις εκδηλώσεις και τις επιπλοκές της νόσου οι οποίες δεν είναι κλινικά ευχερείς. Έχοντας υπ' όψη ότι η διαφορική διάγνωση της υπογαμμασφαιριναιμίας μπορεί να εξελιχθεί σε μια πολύπλοκη διαδικασία, απαραίτητο πρώτο βήμα της διαγνωστικής προσέγγισης είναι η επιβεβαίωση του ευρήματος σε νέο δείγμα αίματος του ασθενούς, ιδιαίτερα στις πολύ συχνές περιπτώσεις όπου η υπογαμμασφαιριναιμία είναι τυχαίο εύρημα. Παροδική υπογαμμασφαιριναιμία μπορεί να παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια οξείων λοιμώξεων ή, αντίθετα, μπορεί να συνοδεύει χρόνιες φλεγμονώδεις διεργασίες ή βαρύ υποσιτισμό. Από την άλλη πλευρά, η έντονη φυσική δραστηριότητα και το μεγάλο στρες, όπως συμβαίνει π.χ. στους αθλητές, είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών. [71]

2.2 CVID

Η CVID είναι μια ετερογενής ομάδα διαταραχών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπογαμμασφαιριναιμία, αδυναμία παραγωγής ειδικών αντισωμάτων, υποτροπιάζουσες ή και χρόνιες λοιμώξεις και αυξημένη επίπτωση λεμφοϋπερπλαστικών και κοκκιωματωδών βλαβών, αυτοάνοσων φαινομένων και κακοήθων νοσημάτων. Πρόκειται για την πρωτοπαθή ανοσοανεπάρκεια που χρήζει ιατρικής φροντίδας συχνότερα από όλα τα άλλα νοσήματα της συγκεκριμένης ομάδας, με τη συχνότητα εμφάνισής της να ανέρχεται σε ποσοστά από 1:10000 με 1:50000. Τα επιδημιολογικά δεδομένα της CVID, βέβαια, όπως και όλων των PIDs, πρέπει να αντιμετωπίζονται με την επιφύλαξη του σφάλματος λόγω του μεγάλου βαθμού της υποδιάγνωσής τους, ο οποίος εκτιμάται ότι είναι της τάξης του 70-90%. [72] Η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Μέχρι πρότινος, θεωρούνταν ότι η εμφάνισή της ήταν συχνότερη κατά τις ηλικίες των 1-5 και των 16-20 ετών. Πρόσφατα, όμως, διαπιστώθηκε, σε μεγάλη σειρά ασθενών, ότι το πρότυπο εμφάνισης της CVID είναι συνεχές, με επικρατέστερη ηλικία εκδήλωσης των συμπτωμάτων την τρίτη δεκαετία της ζωής (μέση ηλικία 26,3 έτη και διάμεση τα 24 έτη). [73] Παρ' ότι δεν αποκλείεται η εκδήλωση της νόσου σε ενήλικα άτομα χωρίς ιστορικό συναφών συμπτωμάτων, μεταξύ της πρώτης εκδήλωσης και της διάγνωσης της CVID παρατηρείται μέση καθυστέρηση της τάξης των 4-6 ετών, που επιβαρύνει μεν την ποιότητα ζωής αλλά δε φαίνεται να επηρεάζει ανεξάρτητα τη θνητότητα των ασθενών. [74]

2.2.1 Κλινική Εικόνα CVID

Οι ασθενείς με CVID εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία σε βακτηριακές, κυρίως, λοιμώξεις (συνηθέστερα από τους *Streptococcus pneumoniae* και *Hemophilus influenzae*) του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, όπως μέση ωτίτιδα, χρόνια ιγμορίτιδα, βρογχίτιδα, οι οποίες συχνά οδηγούν σε βρογχεκτασίες, αποτελώντας τη συχνότερη αιτία θανάτου και χρόνιων προβλημάτων υγείας.[75] Οι λοιμώξεις μπορούν να αφορούν επίσης τη γαστρεντερική οδό, το δέρμα, τα μάτια, το σκελετό και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι ευκαιριακές λοιμώξεις από ιούς, πρωτόζωα και μύκητες είναι σπάνιες, με εξαίρεση τις μυκοπλασματικές λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και των αρθρώσεων, που συχνά ενέχουν σημαντική καταστροφή των ιστών, και τα εντερογενή νοσήματα (όπως η λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος από εντεροϊό)[76]. Τέλος, ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών, πάσχει από χρόνια διάρροια που μπορεί να προκληθεί από διάφορους μολυσματικούς οργανισμούς, όπως οι *Giardia lamblia* ή *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*. Αρκετοί ασθενείς εμφανίζουν επίσης φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και δυσαπορρόφηση, με χαρακτηριστική οξώδη λεμφοπερπλασία και απώλεια των εντερικών λαχνών [75]. Οι λοιμώξεις αποτελούν τη μοναδική κλινική εκδήλωση της CVID στο 30% περίπου των περιπτώσεων. Στους υπόλοιπους ασθενείς, την κλινική πορεία της νόσου, εκτός από τις λοιμώξεις, χαρακτηρίζει η εμφάνιση μιας ποικιλίας φλεγμονωδών ή και αυτοάνοσων διαταραχών[76]. Στις περιπτώσεις αυτές, επιβάλλεται πολλές φορές η χρήση ανοσοκατασταλτικής θεραπείας ποικίλλου βαθμού, γεγονός που επιδεινώνει την πρόγνωση της νόσου.[77] Οι συνηθέστερες αυτοάνοσες εκδηλώσεις της CVID είναι οι κυτταροπενίες και ειδικότερα η αυτοάνοση θρομβοπενική πορφύρα, που απαντάται έως και στο 60% των περιπτώσεων, ακολουθούμενη σε συχνότητα από την αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία. Είναι ενδιαφέρον ότι οι αυτοάνοσες αιματολογικές εκδηλώσεις, φαίνεται να προηγούνται της διάγνωσης της CVID σε ποσοστό 14–54%, ενώ στο 2% περίπου των ασθενών αποτελούν το μοναδικό σύμπτωμα κατά την εμφάνιση της νόσου. Για το λόγο αυτό, εγείρεται η υποψία τυχόν υποκείμενης CVID, σε κάθε περίπτωση αυτοάνοσης θρομβοπενικής πορφύρας ή αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ασθενείς με CVID που είναι επιρρεπείς σε υποτροπιάζουσες λοιμώξεις λόγω αδυναμίας παραγωγής αντισωμάτων, εμφανίζουν και μία επιδεκτικότητα σε αυτοάνοσες διαταραχές. Οι αυτοάνοσες εκδηλώσεις που μπορεί να συνοδεύουν τη CVID είναι η κακοήθης αναιμία, η πρωτοπαθής χολική κίρρωση, η αλωπεκία, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η κοιλιοκάκη, ο ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης, το σύνδρομο Guillain-Barre, η μυασθένεια, η θυρεοειδίτιδα και η δερματομυοσίτιδα[77]. Τέλος, ένα άλλο ενδιαφέρον κλινικό χαρακτηριστικό των ασθενών με CVID, είναι διάφορες νεκρωτικές κοκκιωματώδεις βλάβες που διεισδύουν σε όργανα όπως το ήπαρ, οι λεμφαδένες, οι πνεύμονες, ο μυελός των οστών και το δέρμα κι έχουν συσχετιστεί με την παρουσία σπληνομεγαλίας και με την ανάπτυξη αυτοάνοσων νοσημάτων.[75] Τέλος, οι κλινικοί φαινότυποι φαίνεται να σχετίζονται με τη θνητότητα των ασθενών. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με εντεροπάθεια και αυτοί με πολυκλωνικές

λεμφοκυτταρικές διηθήσεις εμφανίζουν τετραπλάσιο και τριπλάσιο, αντίστοιχα, σχετικό κίνδυνο θνητότητας.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

Η AATD αποτελεί ένα αρκετά υποδιαγεγνώσμενο νόσημα στην Ελλάδα, με συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις την αναπνευστική και ηπατική νόσο. Η ΧΑΠ, το εμφύσημα, οι βρογχεκτασίες που προκύπτουν λόγω της χρόνιας πρωτεολυτικής προσβολής των πνευμόνων, από την καταστροφική δράση της ελαστάσης, αποτελούν από τα πιο συχνά κλινικά συμπτώματα της νόσου, μαζί με την ηπατομεγαλία και την κίρρωση του ήπατος. Οι βρογχεκτασίες, ωστόσο, αποτελούν και μια πολύ συχνή κλινική εκδήλωση στην Κοινή Ποικίλη Ανοσοανεπάρκεια. Οφείλονται στα αυξημένα ποσοστά λοιμώξεων που πλήττουν την αναπνευστική οδό, αποτελώντας τη συχνότερη αιτία θανάτου και χρόνιων προβλημάτων υγείας στους ασθενείς που πάσχουν από PADs.

Υπάρχει μόνο μια μελέτη στη βιβλιογραφία [60], που συσχετίζει το γενετικό τόπο του *SERPINA1* με τη CVID, εξετάζοντας αν η AATD σχετίζεται με τις κλινικές εκδηλώσεις που παρατηρούνται στη CVID. Ωστόσο, η μελέτη περιορίζεται στην ανίχνευση μόνο των 2 πιο κοινών παθολογικών αλληλόμορφων που ευθύνονται για την εκδήλωση της AATD.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, σκοπός αυτής της διπλωματικής, είναι η μελέτη ολόκληρου του γονιδίου που κωδικοποιεί την A1AT, σε μια ομάδα ασθενών που πάσχουν από CVID σε μια προσπάθεια διερεύνησης, αν οι παρατηρούμενες αλλαγές στο γονίδιο, σχετίζονται με τις κλινικές εκδηλώσεις της CVID.

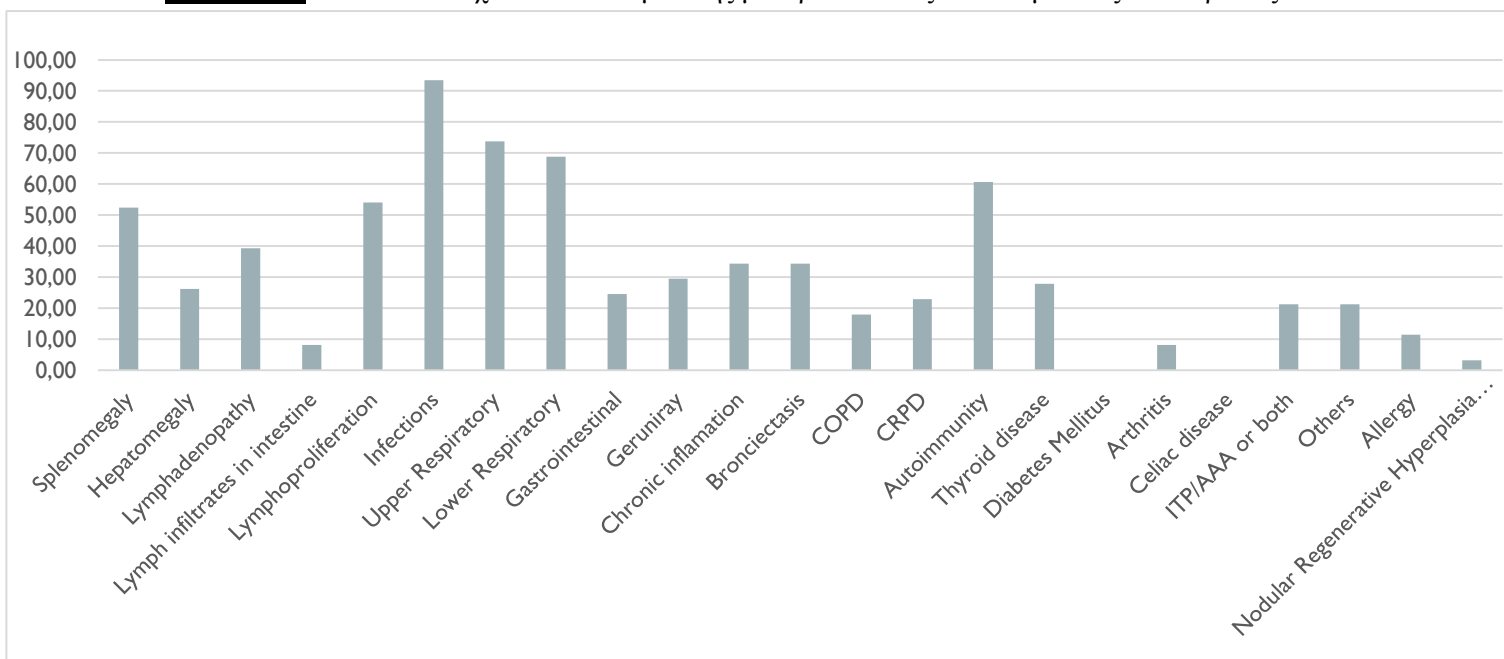
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΑΣΘΕΝΕΙΣ

1.1 Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 61 ασθενείς με αντισωματικές ανεπάρκειες (άνδρες/γυναίκες: 31/30, μέση ηλικία : 35,8 έτη, ηλικιακό εύρος : 4-70 ετών). Τα δείγματα προήλθαν από το Εργαστήριο Ανοσολογίας Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και πρόκειται για ασθενείς που είτε παρακολουθούνται από το ίδιο εργαστήριο είτε στάλθηκαν για ανάλυση από άλλα τμήματα, συμπεριλαμβανομένων των Λαϊκού, Ιπποκράτειο και Παπαγεωργίου Γενικών Νοσοκομείων Θεσσαλονίκης. Ειδικότερα, οι 61 ασθενείς που αξιολογήθηκαν έπασχαν από CVID. Η διάγνωση της CVID, έγινε βάση των τυπικών κριτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των χαμηλών επιπέδων της IgG του ορού, και/ή μίας IgM τιμής άνω των 2 τυπικών αποκλίσεων από την μέση τιμή, μίας απουσίας ή ανώμαλης απάντησης σε εμβόλια, και του αποκλεισμού άλλων αιτιών υπογαμμασφαιριναιμίας. Στα κλινικά χαρακτηριστικά αυτών, 51 ασθενείς με CVID παρουσίασαν λοιμώξεις του ανώτερου και 41 ασθενείς παρουσίαζαν λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Από αυτούς, 12 έπασχαν από ΧΑΠ και 20 εμφάνιζαν βρογχεκτασίες. Όσον αφορά τις ηπατικές διαταραχές, 2 ασθενείς εμφάνιζαν υπερπλασία του ήπατος. Τριανταδύο ασθενείς εμφάνιζαν σπληνομεγαλία, 16 ασθενείς εμφάνιζαν ηπατομεγαλία, ενώ 24 εμφάνιζαν λεμφαδενοπάθειες. Τέλος, 27 ασθενείς παρουσίαζαν αυτοάνοσα νοσήματα και 18, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, ενώ οι νεοπλασίες παρατηρήθηκαν μόνο σε 7 ασθενείς.

Πίνακας 7: Κλινικά στοιχεία ασθενών μελέτης με Πρωτοπαθείς Αντισωματικές Ανεπάρκειες



2.ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΥΛΙΚΑ

Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε μία σειρά αντιδραστηρίων και αναλώσιμων υλικών, τα χαρακτηριστικά των οποίων αναγράφονται στους Πίνακες 5 και 6, αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια και χαρακτηριστικά αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αντιδραστήριο	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Ισοπροπανόλη	Isopropanol	AL0323	Scharlau, Spain
Αιθανόλη 100%	Absolute Ethanol	ET0016	Scharlau, Spain
Αποστειρωμένο νερό	Water for injection	-	DEMO S.A, Greece
Αγαρόζη	peqGOLD Universal- Agarose	35-1020	Peqlab, Deutschland
Βρωμιούχο αιθίδιο	Ethidium Bromide, 10 mg/mL	15585-011	BioRad, USA
Διάλυμα ρυθμιστικό χωρίς MgCl ₂	PCR Run Buffer 10x (-MgCl ₂)	-	BIORON, Germany
Διάλυμα ρυθμιστικό με MgCl ₂	100Mm MgCl ₂	P041311-M	BIORON, Germany
Διάλυμα TBE	TBE buffer (10X)	A0972, 1000	Applichem, USA
Μάρτυρας DNA	100bp DNA Ladder	25-2010	PEQLAB, Deutschland
Ολιγονουκλεοτίδια	100mM dATP	P/N 55082	Invitrogen, UK
	100mM dCTP	P/N 55083	
	100mM dGTP	P/N 55084	
	100mM dTTP	P/N 55084	
Περιοστική ενδονουκλεάση BtsCI	BtsCI Restriction Enzyme	R0647S	New England Biolabs, USA
Πολυμεράση Taq	DFS-Taq DNA polymerase	101005	BIORON, Germany
Χρωστική	Formaldehyde Load Dye	8550G	Ambion, UK
Kit εκχύλισης DNA	QiAamp DNA Blood Mini Kit	51104	Qiagen, Germany
	PureLink® Genomic DNA Kit	K1820-01	Invitrogen, UK
Kit καθαρισμού προϊόντος PCR	QiAquick PCR Purification Kit	28106	Qiagen, Germany
	PureLink® PCR Purification Kit	K3100-01	Invitrogen, UK
Kit εξαγωγής υλικού από γέλη	QiAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen, Germany
	PureLink Quick® Gel Extraction Kit	K2100-12	Invitrogen, UK

Πίνακας 6: Αναλώσιμα και χαρακτηριστικά αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Αναλώσιμα	Όνομα προϊόντος	Αρ.Καταλόγου	Προέλευση
Βαθμονομημένη πιπέτα 0,2-2 μL	0,2-2 μL pipette, sterile	F144801	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 1-10 μL	1-10 μL pipette, sterile	F144802	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 2-20 μL	2-20 μL pipette, sterile	F123600	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 20-100 μL	20-100 μL pipette, sterile	F123615	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 50-200 μL	50-200 μL pipette, sterile	F123601	Gilson Inc, USA
Βαθμονομημένη πιπέτα 200-1000 μL	200-1000 μL pipette, sterile	F123602	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 10 μL	10 μL sterilised long tips	DL10ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 100 μL, με φίλτρο	100 μL sterilised filter tips	DF100ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 1000 μL	1000 μL sterilised filter tips	DF1000ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 μL	200 μL sterilised tips	D200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 200 μL, με φίλτρο	200 μL sterilised filter tips	DF200ST	Gilson Inc, USA
Ρύγχη πιπέτας 30 μL, με φίλτρο	30 μL sterilised filter tips	DF30ST	Gilson Inc, USA
Σωληνάρια γενικής αίματος	S-Monovette® Haematology EDTA K ₃ tubes	04.1917	SARSTEDT, GERMANY
Φιαλίδιο PCR	PCR tubes, Flat cap, sterile	683201	GREINER BIO-ONE, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 1.5 mL	Rnase- Dnase free, 1,5 mL microfuge tubes	AM12400	Ambion, USA
Φιαλίδιο φυγοκέντρησης 15 mL	15 mL centrifuge tubes- sterile,	430791	Corning, USA
Sterile Disposable Scalpel	Shangai Medex International	GRF-2980	MedExSupply, USA

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΡΕΥΝΑΣ

3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα

Για την απομόνωση του DNA, χρησιμοποιήθηκε ειδικό σύστημα της PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen) για την επιλεκτική δέσμευση του DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία αλάτων. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή του παρασκευάσματος, για την

απομόνωση γενετικού υλικού από ολικό περιφερικό αίμα και τον καθαρισμό του από προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικούς αναστολείς. Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε με βάση το PureLink® Genomic DNA Kit. Σε σωληνάριο φυγοκέντρωσης των 1.5 mL μεταφέρθηκαν 200 μL από κάθε φιαλίδιο γενικής περιφερικού αίματος με αντιπηκτικό EDTA. Μετά από προσθήκη 20 μL πρωτεΐνάσης K, για τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών στις καρβοξυτελικές θέσεις αλειφατικών, αρωματικών και υδρόφοβων αμινοξέων, και 20 μL RNAάσης για την απομάκρυνση του RNA που υπάρχει στο δείγμα, ακολούθησε ανάδευση (vortex) και επώαση για 2 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος λύσης (PureLink® Genomic Lysis/ Binding Buffer) το οποίο ενισχύει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνάσης K, στοχεύει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και κατ'επέκταση στην αποτελεσματική λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, το δείγμα επώαστηκε στους 55° C για 25 λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης 96-100%, που σε συνδυασμό με το διάλυμα λύσης επιτρέπει τον υψηλό βαθμό πρόσδεσης του DNA στη στήλη, και το μείγμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη (PureLink® Spin Column). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 10.000 στροφές (rcf) για 1 λεπτό και ακολούθησαν δύο διαδοχικές πλύσεις της στήλης, με προσθήκη 500 μL από τα διαλύματα Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2, διαδοχικά. Η στήλη φυγοκεντρήθηκε στις 10.000 στροφές για 1 λεπτό και στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά, αντίστοιχα, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν προσμίξεις (πρωτεΐνες, RNA) και ενζυμικοί αναστολείς. Στο τελικό στάδιο, η στήλη μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο φυγοκέντρωσης των 1,5 mL όπου και προστέθηκαν 100 μL διαλύματος έκλουσης (PureLink Genomic Elution Buffer) και μετά από επώαση 1 λεπτού, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές για 1 min. Η τελική συγκέντρωση του DNA ανέρχονταν περίπου στα 50-200 ng/μL. Τα δείγματα DNA διατηρούνται στους 2-8 oC για λίγες μέρες ή κατά προτίμηση στους -20 oC για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

3.2.1 PCR για το γονίδιο *SERPINA1*

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, με εκκινητές προερχόμενους από τη διεθνή βιβλιογραφία, [78] με σκοπό την ενίσχυση 6 εξονίων του γονιδίου *SERPINA1*. Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται αναλυτικά, η νουκλεοτιδική σύσταση και το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς επίσης και το μέγεθος του γονιδιακού προϊόντος που ενισχύεται.

Πίνακας 7: Νουκλεοτιδική σύσταση και μήκος εκκινητών, μήκος γονιδιακού προϊόντος μετά από ενίσχυση με PCR.

Εξόνιο	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μήκος (bp)	Μήκος (bp) προϊόντος PCR
Εξόνιο 1a	5'- AAG GCT CCT TCCTGT CCA AG - 3'	20 bp	494 bp
	5'- CGC TGC TCT ACA TCC ACT CA - 3'	20 bp	
Εξόνιο 1b/c	5'- CCA TCA AGA GGG TGT TTG TGT - 3'	21 bp	676 bp
	5'- CGG ATA CCC ACT CCA CAA C - 3'	19 bp	
Εξόνιο 2	5'- GTA CTT GGC ACA GGC TGG TT - 3'	20 bp	862 bp
	5'- ATG CAT TGC CAA GGA GAG TT - 3'	20 bp	
Εξόνιο 3	5'- GAG GGA TGT GTG TCG TCA AG - 3'	20 bp	521 bp
	5'- TAG CAG TGA CCC AGG GAT GT - 3'	20 bp	
Εξόνιο 4	5'- TAG TGT GGG TGG AGG ACA CA - 3'	20 bp	397 bp
	5'- TAG TGT GGG TGG AGG ACA CA - 3'	20 bp	
Εξόνιο 5	5'- GTG ACA GGG AGG GAG AGG AT - 3'	20 bp	493 bp
	5'- CTG TTA CCT GGA GCC CAC AT - 3'	20 bp	

Στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν 3 τύποι πολυμερασών – η DFS Taq Polymerase, η Top Taq Polymerase και η MyTaq Polymerase. Όσον αφορά την DFS Taq, σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενομικού DNA, 210 $\mu\text{mol/L}$ από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 1.02 pmol από τον κάθε εκκινητή, 1.52 mmol/L MgCl_2 and 0.04 U/ μL του ενζύμου Taq πολυμεράση. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μL .

Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται οι θερμοκρασίες, η διάρκεια του κάθε σταδίου καθώς και οι κύκλοι στους οποίους διεξήχθησαν οι συνθήκες της αντίδρασης. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκε ο αυτόματος κυκλικός μετατροπέας θερμοκρασίας Applied Biosystems Veriti 96 well thermal cycler.

Επίσης, ακολουθήθηκαν όλες οι προφυλάξεις για την αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων. Προκειμένου να ελεγχθεί η καθαρότητα των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα συμπεριλήφθηκε ένα σωληνάριο ως

μάρτυρας με dH₂O, αντί γενετικού υλικού. Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% και για την απεικόνισή τους εκτέθηκαν σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Πίνακας 8 : Οι συνθήκες PCR για την ενίσχυση των 6 εξονίων του γονιδίου SERPINA1 (χρήση της Top Taq Polymerase)

Στάδιο		Εξόνιο					
		1a	1b/c	2	3	4	5
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	Θερμοκρασία	94oC					
	Διάρκεια	2min					
Αποδιάταξη (Denaturation)	Θερμοκρασία	94oC					
	Διάρκεια	30sec					
Υβριδισμός (Annealing)	Θερμοκρασία	58oC	58oC	60oC	57oC	57oC	58oC
	Διάρκεια	30sec	1min	1min	30sec	30sec	30sec
Επέκταση (Extension)	Θερμοκρασία	72oC					
	Διάρκεια	1min					
Τελική επέκταση (Final	Θερμοκρασία	72oC					

Extension)	Διάρκεια	5min
Κύκλοι		34 cycles

Πίνακας 9 : Οι συνθήκες PCR για την ενίσχυση των 6 εξονίων του γονιδίου SERPINA1 (χρήση της DFS Taq Polymerase)

Στάδιο		Εξόνιο					
		1a	1b/c	2	3	4	5
Αρχική αποδιάταξη (First denaturation)	Θερμοκρασία	94oC					
	Διάρκεια	2min					
Αποδιάταξη (Denaturation)	Θερμοκρασία	94oC					
	Διάρκεια	30sec					
Υβριδισμός (Annealing)	Θερμοκρασία	60oC	61oC	60oC	61oC	60oC	62oC
		30sec	1min	1min	30sec	30sec	30sec

	Διάρκεια	
Επέκταση (Extension)	Θερμοκρασία	72oC
	Διάρκεια	1min
Τελική επέκταση (Final Extension)	Θερμοκρασία	72oC
	Διάρκεια	5min
Κύκλοι		32 32 32 32 30 32

3.2.2 Real Time PCR

Η παρουσία, συγκεκριμένα, του πολυμορφισμού Z ελέγχθηκε, επίσης, και με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR) με τη χρήση εκκινητών, επίσης, διεθνούς βιβλιογραφίας.[79] Στον πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά, η νουκλεοτιδική σύσταση και το μήκος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 10 : Οι συνθήκες RT-PCR για την ανίχνευση του Z απλότυπου

	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Μήκος (bp)
Primer Z Forward	5'-GCTTCCTGGGAGGTGTCCACG-3'	21 bp
Primer Z Reverse	5'-TTCCCATGAAGAGGGGAGACTTGG-3'	24 bp
Probe Z wild type	5' - [ROX]-CCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTCGTC-[BHQ2] -3'	26 bp
Probe Z mutant	5' - [FAM] -CCAGCAGCTTCAGTCCCTTTCTTGTC- [BHQ1]-3'	26 bp

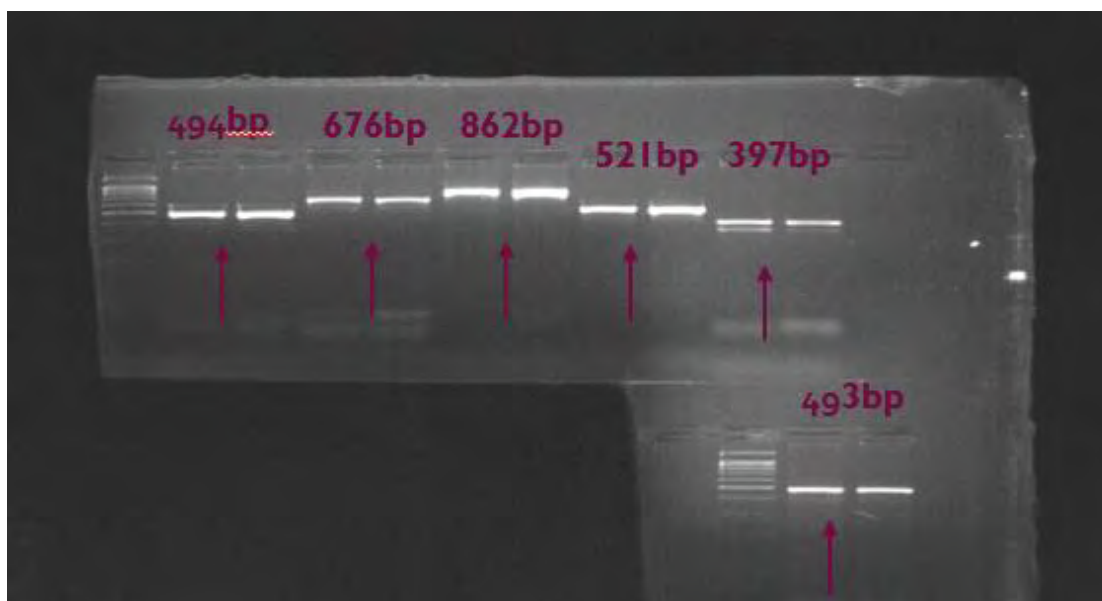
Στις αντιδράσεις RT-PCR, χρησιμοποιήθηκαν 125μl Rotor gene Master Mix, 5μl από τους εκκινητές Forward και Reverse συγκέντρωσης 20μM, 1.25μl από τους probes wild type και mutant και 92.5μl dH₂O (stock για 10 δείγματα). Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 25 μL. Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται οι θερμοκρασίες, η διάρκεια του κάθε σταδίου καθώς και οι κύκλοι στους οποίους διεξήχθησαν οι συνθήκες της αντίδρασης.

Πίνακας 11: Συνθήκες RT-PCR για την ταχεία ανίχνευση της Z μετάλλαξης

Κύκλος	Σημείο κύκλου
Hold @ 95°C, 3 min 0 secs	
Cycling (40 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 3 secs
	Step 2 @ 69°C, hold 10 secs, acquiring to Cycling A([Green][1][1],[Orange][3][3])

3.2.3 Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε γέλη αгарόζης

Για τον έλεγχο του μεγέθους των προϊόντων της PCR καθώς και των καθαρισμένων προϊόντων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης [2% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE]. Για τον εντοπισμό των ζωνών DNA στο πήκτωμα, προστέθηκε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 0.5 ng/mL. Πρόκειται για μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται σε μόρια DNA και να φθορίζει, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Σε κάθε δείγμα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye) σε αναλογία 1/6 του όγκου του δείγματος που ηλεκτροφορείται (5 μ L δείγματος, 1 μ L χρωστική) προκειμένου να είναι διακριτή η μετανάστευσή τους στη γέλη. Κατόπιν, το κάθε μείγμα μεταφέρεται στις οπές της και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V και 400 mA για 30-35 min, ανάλογα με το μέγεθος που έχει το προϊόν της PCR. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων PCR και των καθαρισμένων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ο 100 bp DNA Ladder. Η φωτογράφιση της γέλης έγινε υπό υπεριώδες φως (DNR Bio-Imaging Systems, SerialNo. M031308) και του συνοδού λογισμικού «gel capture» (DNR Bioimaging Systems), ενώ οι φωτογραφίες αποθηκεύτηκαν σε μορφή bitmap.



Εικόνα 9 : Ενδεικτική φωτογραφία ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης, όπου απεικονίζονται τα μεγέθη των 6 εξονίων του γονιδίου *SERPINA1* σε bp.

3.2.4 Καθαρισμός των προϊόντων PCR προς ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing)

Η παρουσία γενετικών ποικιλομόρφων στο γονίδιο *SERPINA1* ελέγχθηκε με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) κατά Sanger, μετά από καθαρισμό των προϊόντων PCR. Πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη αλληλούχιση με τη χρήση του BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) και του γενετικού αναλυτή αλληλουχίας βάσεων ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, CA). Ο καθαρισμός των προϊόντων PCR έγινε με τη χρήση των Purelink PCR Purification Kit/QiAquick PCR Purification Kit. Το σύστημα απομόνωσης αποσκοπούσε στην απομάκρυνση εκκινήτων, νουκλεοτιδίων, ενζύμων και αλάτων και βασίζεται στην επιλεκτική δέσμευση του δίκλωνου DNA σε μεμβράνη με βάση το πυρίτιο, παρουσία αλάτων.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την προσθήκη διαλύματος πρόσδεσης που περιέχει ισοπροπανόλη (Binding Buffer) σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR, σε όγκο διπλάσιο από τον αρχικό, και κατόπιν, μεταφορά σε ειδικές στήλες (Purelink PCR Purification Kit) για την προσρόφηση του DNA στη στήλη. Μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 στροφές για 30 sec και απομάκρυνση του διαλύματος της φυγοκέντρωσης, ακολουθεί πλύση της στήλης με προσθήκη 700 μ L ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχουν αιθανόλη (Wash Buffer). Πραγματοποιούνται φυγοκεντρήσεις στις 11.000 στροφές (rcf / g) για 1min διαδοχικά και έπειτα ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση (11.000 στροφές για 3 min), χωρίς την προσθήκη άλλου διαλύματος, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης από την στήλη. Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 1.5 mL, προστίθενται σε αυτή 30 μ L διαλύματος έκλουσης (elution) (10 Mm Tris-HCL, pH 8.5) και μετά από επώαση 1 min, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 11.000 στροφές για 1 min.

3.2.5 Ανάλυση αλληλουχίας βάσεων κατά Sanger

Για τη μελέτη των πολυμορφισμών του *SERPINA1* πραγματοποιήθηκε ανάλυση αλληλουχίας βάσεων κατά Sanger, η οποία απαιτούσε τη χρήση ειδικού kit (Applied Biosystems, Big Dye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing kit) και γινόταν στο γενετικό αναλυτή ABI 3730 XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη συσχέτιση των μεταβλητών της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 (chi square test) με τη διόρθωση κατά Yates. Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η απόκλιση όταν $p < 0,05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Πολυμορφισμοί του γονιδίου που κωδικοποιεί την A1AT

Ένα πλήθος σημειακών αντικαταστάσεων ανιχνεύθηκε τόσο σε ετεροζυγωτία όσο και σε ομοζυγωτία, με ή χωρίς λειτουργική σημασία, στους ασθενείς της μελέτης. Μία σύνοψη αυτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 12. Σε αυτές, περιλαμβάνονται ο σπάνιος Z απλότυπος ο οποίος ανιχνεύθηκε σε ετεροζυγωτία (MZ), συχνοί πολυμορφισμοί που συναντώνται στον πληθυσμό, 3 συνώνυμα ποικιλόμορφα και 2 ιντρονικές μεταλλάξεις, εκ των οποίων η 1 δεν είχε περιγραφεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία. Το μετάγραφο της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η ανάλυση είναι το SERPINA1/208 με κωδικό ENST00000448921.5. Στην αρίθμηση των αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης, συμπεριλαμβάνονται και τα 24 αμινοξέα του N-τελικού της άκρου, που αποκόπτονται κατά την ωρίμανσή της, πριν εκκριθεί στην κυκλοφορία.[78]

Αναλυτικότερα, η E366K μετάλλαξη που προκύπτει από μια αντικατάσταση γουανίνης από αδενίνη στη νουκλεοτιδική θέση 17083 (g.17083G>A, c.1096G>A, rs28929474) του εξονίου 5 και οδηγεί στην αμινοξική αντικατάσταση ενός γλουταμινικού οξέος από μια λυσίνη στη θέση 366 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (**p.Glu366Lys**), παρατηρήθηκε σε 3 ασθενείς. Στον κλινικό τους φαινότυπο, περιλαμβάνονταν η ηπατική νοσολογία, ως κοινή κλινική εκδήλωση. Πιο συγκεκριμένα, η μία ασθενής, εμφάνιζε βαριά εικόνα ηπατικής κίρρωσης, η οποία δε δικαιολογούνταν από τη CVID. Η παθογόνος αυτή μετάλλαξη, έχει καταστεί υπεύθυνη για περίπου το 95% των κλινικών περιπτώσεων των ασθενών που πάσχουν από σοβαρής μορφής AATD.[80] Η E366K βλάβη, προκαλεί τη μετατόπιση μιας γέφυρας άλατος σε μια λυσίνη στη θέση 290 και ενός δεσμού υδρογόνου σε μια θρεονίνη στη θέση 203 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, προκαλώντας τη λάθος αναδίπλωση της πρωτεΐνης εντός του ενδοπλασματικού δικτύου. Το γεγονός το οποίο οδηγεί στη μειωμένη παραγωγή της από τα ηπατοκύτταρα και στη δραματική μείωσή της κατά 85-95% στον ορό, στα ομόζυγα άτομα, σε αντίθεση με τα ετερόζυγα άτομα που εμφανίζουν κατά 40% μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης.[80] Έχει βρεθεί πως τα άτομα που φέρουν σε ομοζυγωτία το Z αλλήλιο, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ΧΑΠ, εμφυσήματος, καθώς και ηπατικής νόσου.[81][5] Μελέτες έχουν δείξει, πως η E366K μετάλλαξη καθιστά την πρωτεΐνη 5 φορές περίπου λιγότερο αποτελεσματική, σε σχέση με το φυσιολογικό M αλλήλιο, ως προς την αναστολή της ελαστάσης των ουδετεροφίλων, και οδηγεί στην εμφάνιση πολυμερών στον πνεύμονα που λειτουργούν χημειοτακτικά για τα ουδετερόφιλα, εντείνοντας το βαθμό της φλεγμονής.[14][16]

Μια αντικατάσταση γουανίνης από αδενίνη στο νουκλεοτίδιο 12829 (g.12829 G>A, c.374G>A, rs709932) του εξονίου 2, όπου μια αργινίνη αντικαθίσταται από μια ιστιδίνη στη θέση 125 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (**p.Arg125His**), ανιχνεύθηκε σε 18 ασθενείς (2 εκ των οποίων την έφεραν σε ομοζυγωτία) που εμφάνιζαν λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός, έχει προταθεί, πως δεν έχει κάποια λειτουργική ή κλινική σημασία και αποτελεί την M2 παραλλαγή της πρωτεΐνης [2]. Η M2 παραλλαγή δεν εμφανίζει διαφορές με την M(val213) , με εξαίρεση 2 αλλαγές. Η μία αφορά στο κωδικόνιο 125 όπου η αλλαγή τριπλέτας **CGT** σε **CAT**, οδηγεί σε μια αμινοξική αλλαγή μιας αργινίνης από μια ιστιδίνη και η άλλη αφορά στο κωδικόνιο 376 όπου η τριπλέτα **GAA** μετατρέπεται σε **GAC**, με αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός γλουταμινικού οξέος από ένα ασπαρτικό οξύ. Εφόσον οι 2 μεταλλάξεις διαφοροποιούν τις 2 αυτές παραλλαγές, προτάθηκε πως μία άλλη μορφή (M3) της πρωτεΐνης, αποτελεί ένα ενδιάμεσο στην εξέλιξη του γονιδίου.[82]

Μια αντικατάσταση θυμίνης από κυτοσίνη στο νουκλεοτίδιο 14615 (g.14615T>C, c.710T>C, rs6647) του εξονίου 3, όπου μια βαλίνη αντικαθίσταται από μια αλανίνη στη θέση 237 (**p.Val237Ala**) της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, ανιχνεύθηκε σε 33 από τους 61 ασθενείς με CVID, 3 εκ των οποίων την έφεραν σε ομοζυγωτία. Η συγκεκριμένη παραλλαγή, επίσης δεν έχει κάποια κλινική σημασία και θεωρείται, αφενός, πως αποτελεί την πρώιμη παραλλαγή της πρωτεΐνης (M1A) και αφετέρου, πως οι εξίσου συχνές M1V, M1 και M3 παραλλαγές προκύπτουν από αυτή, μέσω σημειακών αντικαταστάσεων. Η M2 παραλλαγή που προκύπτει από την M3 εμφανίζει τις ίδιες αμινοξικές διαφορές που διαφοροποιούν την M3 από την M1V και ακόμη μια αντικατάσταση βάσης. Οι 4 πλέον φυσιολογικές παραλλαγές της πρωτεΐνης θεωρούνται η βάση, από την οποία προκύπτουν όλα τα υπόλοιπα αλλήλια.[83]

Μια ακόμη συχνή αντικατάσταση αδενίνης από κυτοσίνη στη νουκλεοτιδική θέση 17187 (g.17187A>C, c.1200A>C, rs1303) του εξονίου 5, που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός γλουταμινικού από μια ασπαργίνη στη θέση 400 της νουκλεοτιδικής αλυσίδας (**p.Glu400Asp**), παρατηρήθηκε σε 20 ασθενείς (5 εκ των οποίων την έφεραν σε ομοζυγωτία). Αποτελεί ένα συχνό πολυμορφισμό που έχει περιγραφεί, ως σημειακή διαφορά μεταξύ της παραλλαγής M1(val213) και M3, λόγω μιας αλλαγής της τριπλέτας **GAA** σε **GAC** στο κωδικόνιο 376 (γλουταμινικό οξύ προς ασπαργίνη).[82]

Εν συνεχεία, ανιχνεύθηκε μια αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη στη νουκλεοτιδική θέση 17164 (g.17164C>T, c.1177C>T, rs61761869) του εξονίου 5, όπου μια προλίνη αντικαθίσταται από μια σερίνη, στη θέση 393 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (**p.Pro393Ser**). Ο ασθενής εμφάνιζε λεμφαδενοπάθειες, λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού και ουροποιητικού συστήματος κι εντεροπάθεια. Η μετάλλαξη έχει χαρακτηριστεί ως πιθανά παθογόνος, ειδικότερα στην περίπτωση που εμφανίζεται σε ετεροζυγωτία με την S μετάλλαξη. Έχει εμφανιστεί σε ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με μειωμένα επίπεδα A1AT που δεν εμφάνιζε αναπνευστική ή ηπατική νόσο.[84] Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι αυτή η μετάλλαξη προκαλεί δραματική μείωση των επιπέδων της A1AT τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. [85] Επίσης, έχει βρεθεί ακόμη μια

μετάλλαξη στην ίδια θέση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (**p.Pro393Leu**), η οποία έχει χαρακτηριστεί εξίσου ως παθογόνος.[86] Το γεγονός αυτό, οδηγεί στο συμπέρασμα πως η προλίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης και πως άλλου είδους αντικαταστάσεις στη συγκεκριμένη θέση, ίσως αποτελούν εξίσου παθογόνες.

Σε 2 ασθενείς ανιχνεύθηκε μια αντικατάσταση γουανίνης από αδερίνη στη νουκλεοτιδική θέση 17028 (g.17028G>A, c.1066-25G>A, rs372571769). Στην κλινική εικόνα των ασθενών περιλαμβάνεται η κοκκιωματώδης νόσος, εκδηλώσεις αυτοανοσίας, η χρόνια φλεγμονή, οι λοιμώξεις του αναπνευστικού, οι λεμφαδενοπάθειες, η ηπατομεγαλία και η σπληνομεγαλία.

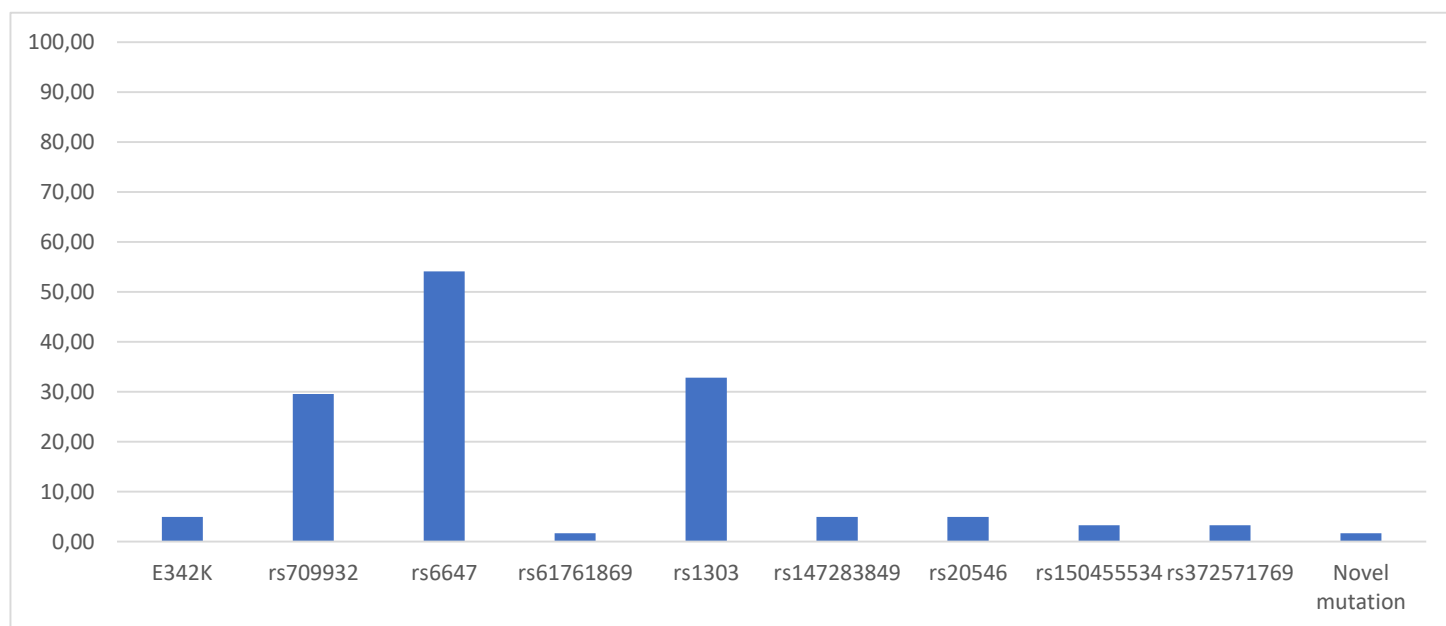
Επιπλέον, μία σειρά 3 ετερόζυγων σημειακών αντικαταστάσεων, που οδηγούν σε συνώνυμες αλλαγές, ανιχνεύθηκαν στις ομάδες των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Τα ποικιλόμορφα αυτά, εντοπίζονται στο εξόνιο 2 του γονιδίου και είναι τα g.12498C>T (c.43C>T, **p.Leu15=**, rs147283849) το οποία βρέθηκε σε 3 ασθενείς, το g.12879C>T, (c.424C>T, **p.Leu142=**, rs20546) που ανιχνεύθηκε σε επίσης 3 ασθενείς και το g.16131C>T (c.967C>T, **p.Leu323=**, rs150455534) που ταυτοποιήθηκε 2 ασθενείς.

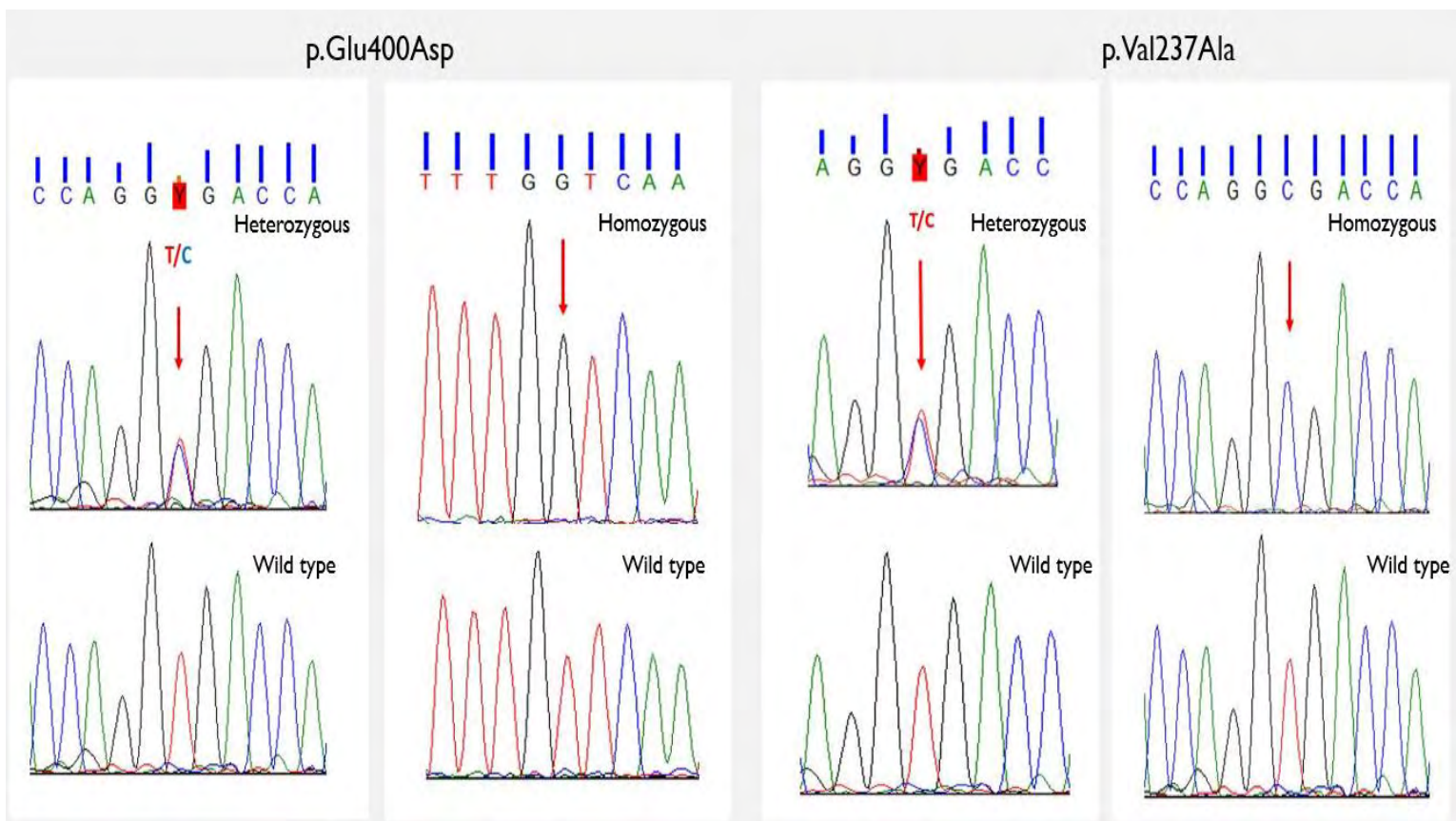
Τέλος, από το σύνολο των ασθενών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκε μία νέα μετάλλαξη σε ετεροζυγωτία, που αφορά στην αντικατάσταση μιας θυμίνης από μια κυτοσίνη στη νουκλεοτιδική θέση 16966 (g.16966T>C, c.1066-87T>C) στο ιντρόνιο 4, η οποία δεν είχε περιγραφεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία. Ανιχνεύθηκε σε έναν ασθενή και στα κλινικά του χαρακτηριστικά περιλαμβάνονταν η εντεροπάθεια, οι αλλεργίες, οι εκδηλώσεις αυτοανοσίας, χρόνια φλεγμονή και λοιμώξεις της ανώτερης αναπνευστικής οδού.

Πίνακας 11: Συχνότητα εμφάνισης αλληλίου των πολυμορφισμών που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς της μελέτης και τους Ευρωπαίους. (από: <http://exac.broadinstitute.org/>.)

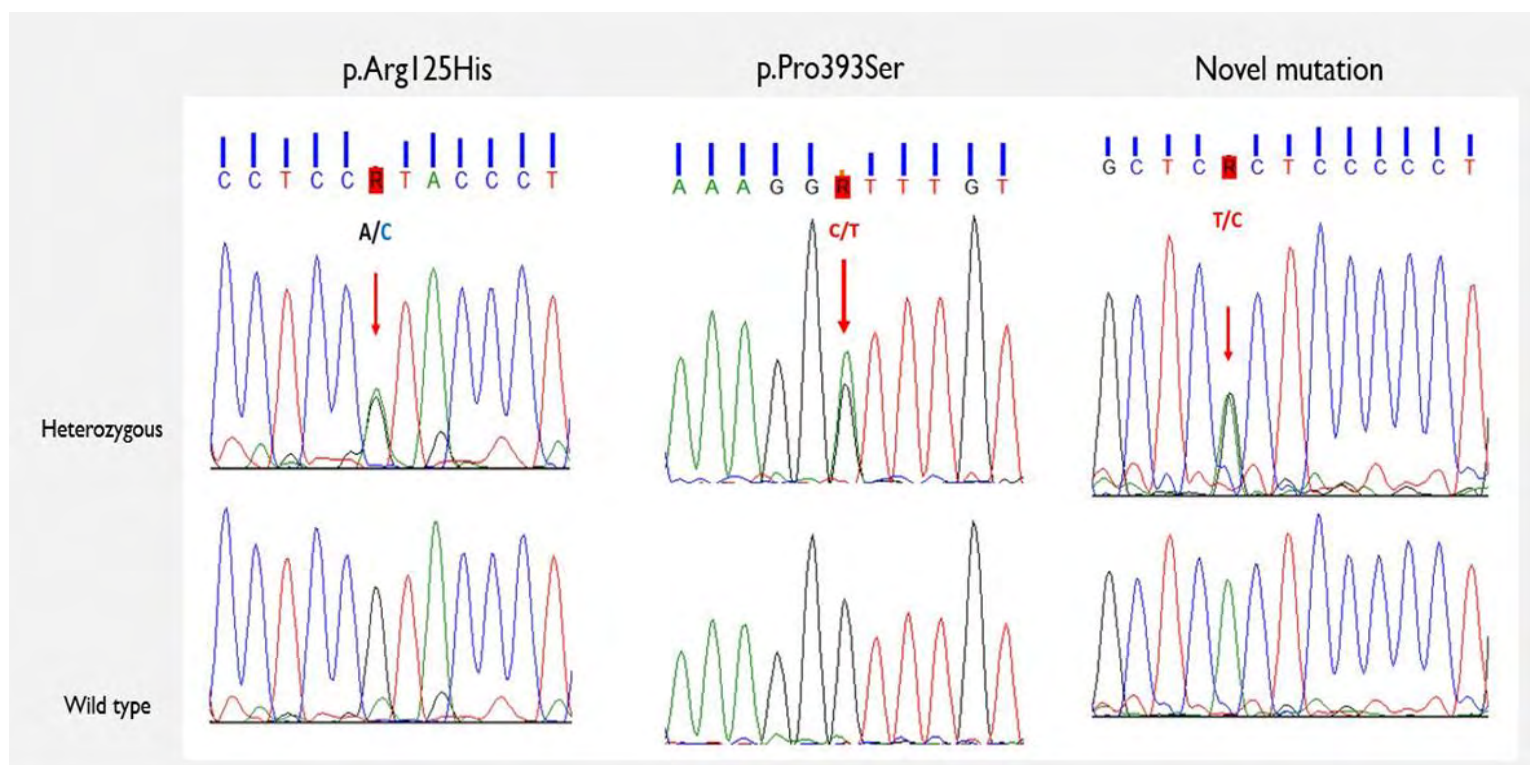
Περιοχή	g.DNA	c.DNA	πρωτεΐνη	rs	Γενικός πληθυσμός (Συχνότητα αλληλίου) (Exac Browser Beta)	CVID	
						Ασθενείς (n)	Συχνότητα αλληλίου
εξόνιο5	g.17083G>A	c.1096G>A	E342K	rs28929474	0.01831	3	0.0246
	g.17164C>T	c.1177C>T	p.Pro393Ser	rs61761869	0.0004346	1	0.0082
εξόνιο3	g.17187A>C	c.1200A>C	p.Glu400Asp	rs1303	0.2581	20	0.2049
	g.14615T>C	c.710T>C	p.Val237Ala	rs6647	0.225	33	0.2951
εξόνιο2	g.12829G>A	c.374G>A	p.Arg125His	rs709932	0.1641	18	0.1639
ιντρόνιο4	g.17028G>A	c.1066-25G>A		rs372571769	0.0003564	2	0.0164
εξόνιο4	g.16131C>T	c.967C>T	p.Leu323=	rs150455534	0.0001951	2	0.00164
	g.12498C>T	c.43C>T	p.Leu15=	rs147283849	0.001069	3	0.00246
εξόνιο2	g.12879C>T	c.424C>T	p.Leu142=	rs20546	0.02069	3	0.00246
ιντρόνιο4	g.16966T>C	c.1066-87T>C		novel	n/a	1	0.0082

Πίνακας 12: Ποσοστά επί τοις 100% των σημειακών αντικαταστάσεων που παρατηρήθηκαν στη μελέτη.





Εικόνα 10 : Σχηματική απεικόνιση των παραλλαγών **Glu400Asp, Val237Ala**



Εικόνα 11 : Σχηματική απεικόνιση των παραλλαγών **Arg125His, Pro393Ser**

Με την ανάλυση χ^2 , προέκυψε πως η παρουσία των 3 πιο συχνών πολυμορφισμών της μελέτης (rs1303, rs6647, rs7099032) δε σχετιζόταν με την εμφάνιση ηπατομεγαλίας, λοιμώξεων της κατώτερης και ανώτερης αναπνευστικής οδού, ΧΑΠ, βρογχεκτασιών, ηπατικής νόσου, θυρεοειδή και άλλων δημογραφικών ή κλινικών χαρακτηριστικών.

Πίνακας 12: Ενδεικτική απεικόνιση των p τιμών από τη δοκιμασία χ^2 για τη συσχέτιση της παρουσίας των 3 πιο παρατηρούμενων πολυμορφισμών του γονιδίου *SERPINA1* με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

Γονίδιο		CVID n(24)	Hepatomegaly	Upper Respiratory Track	Lower Respiratory Track	COPD	Bronchiectasis	Nodular Regenerative Hyperplasia of Liver	Thyroid
SERPINA1	rs1303	18/heterozygous 6/homozygous	8 (33.3%)	19 (20.1%)	16 (66.7%)	4 (16.7%)	8 (33.3%)	2 (8.3%)	10 (41.7%)
p* value			0.310	0.451	0.767	0.823	0.885	0.074	0.053
Γονίδιο		CVID n(33)	Hepatomegaly	Upper Respiratory Track	Lower Respiratory Track	COPD	Bronchiectasis	Nodular Regenerative Hyperplasia of Liver	Thyroid
SERPINA1	rs6647	30/heterozygous 3/homozygous	8 (24.2%)	30 (90.9%)	24 (72.7%)	8 (24.2%)	11 (33.3%)	0 (0%)	10 (30.3%)
p* value			0.702	0.094	0.478	0.171	0.845	0.118	0.645
Γονίδιο		CVID n(18)	Hepatomegaly	Upper Respiratory Track	Lower Respiratory Track	COPD	Bronchiectasis	Nodular Regenerative Hyperplasia of Liver	Thyroid
SERPINA1	rs7099032	16/heterozygous 2/homozygous	7 (38.9%)	15 (83.8%)	13 (72.7%)	2 (11.1%)	7 (38.9%)	0 (0%)	7 (38.9%)
p* value			0.146	0.970	0.713	0.363	0.635	0.352	0.214

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, αναλύθηκε ολόκληρο το γονίδιο *SERPINA1* σε ασθενείς με CVID. Στα ευρήματά μας, εντάσσονται 3 ασθενείς που φέρουν σε ετεροζυγωτία το παθολογικό Z αλληλόμορφο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως και οι 3 ασθενείς εμφανίζουν ηπατική νόσο. Μιας και το ποσοστό αυτό είναι αρκετά υψηλό και με δεδομένη τη σπανιότητα του Z αλληλόμορφου, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος που θα μπορούσε να διαδραματίζει αυτή η μετάλλαξη, στην ηπατική νοσολογία ασθενών με CVID.

Στο δείγμα των ασθενών της μελέτης παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό 3 πολυμορφισμοί του γονιδίου *SERPINA1*, η συχνότητα των οποίων ταυτίζεται με αυτή που ανευρίσκεται στο γενικό πληθυσμό, όπως προκύπτει από δεδομένα του Exac Browser Beta για τον Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Ωστόσο, μετά από στατιστική ανάλυση, δε διαπιστώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας αυτών των πολυμορφισμών με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Αξίζει να σημειωθεί πως, παρά το γεγονός πως το S αποτελεί πιο κοινό παθολογικό αλληλόμορφο σε σύγκριση με το Z, δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν από τους ασθενείς της μελέτης.

Από τη βιβλιογραφία, προκύπτει μόνο μια μελέτη των Sansom et al. το 2002, που συσχετίζει την AATD με τη CVID. Ωστόσο, η μελέτη περιορίζεται στην ανίχνευση των πιο κοινών παθολογικών αλληλόμορφων S και Z, εστιάζοντας στη διερεύνηση της σχέσης ανάμεσα στις βρογχεκτασίες που παρατηρούνται στη CVID και την AATD. Στα αποτελέσματά της περιλαμβάνεται η αυξημένη κατανομή του Z παθολογικού αλληλόμορφου σε μια υποομάδα ασθενών που πάσχουν από CVID και εμφανίζουν βρογχεκτασίες, προτείνοντας πως το Z παθολογικό αλληλόμορφο φαίνεται να εμπλέκεται στη διακύμανση των κλινικών εκδηλώσεων της CVID που αφορούν την αναπνευστική νόσο.

Σε αντίθεση, η δική μας μελέτη, διαφοροποιήθηκε σε 2 σκέλη. Και όσον αφορά τη μελέτη του γονιδίου, αλλά και όσον αφορά τη συσχέτιση των αλλαγών που θα παρατηρούνταν στο γονίδιο, με όλο το φάσμα των κλινικών εκδηλώσεων στη CVID.

Η AATD έχει συσχετιστεί με πληθώρα άλλων νοσημάτων, ένα από τα οποία αποτελεί και η CVID. Οι κλινικές εκδηλώσεις που παρατηρούνται στις 2 νόσους συγκλίνουν όσον αφορά το κομμάτι των αναπνευστικών διαταραχών, των βρογχεκτασιών και της ηπατικής νόσου. Στη δική μας μελέτη, εξετάστηκε για 1^η φορά στη βιβλιογραφία ολόκληρο το γονίδιο που κωδικοποιεί την A1AT με σκοπό να διερευνηθεί το ενδεχόμενο, οι αλλαγές που παρατηρούνται στην A1AT να σχετίζονται με τον κλινικό φαινότυπο των ασθενών που πάσχουν από CVID. Ανιχνεύθηκε πλήθος σημειακών αντικαταστάσεων, τόσο ομόζυγων όσο και ετερόζυγων σε όλους τους ασθενείς με CVID. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν 5

παρευρμηγνέσιμες μεταλλάξεις (**E366K**, **p.Pro393Ser**, **p.Glu400Asp**, **p.Val237Ala** και **p.Arg125His**), 3 συνώνυμες μεταλλάξεις (**p.Leu323=**, **p.Leu15=** και **p.Leu142=**), και 2 ιντρονικές μεταλλάξεις (c.1066-25G>A, rs372571769 και g.16966T>C, c.1066-87T>C) εκ των οποίων η μία (g.16966T>C, c.1066-87T>C) ήταν novel, δεν είχε περιγραφεί προηγουμένως στη βιβλιογραφία και δε γνωρίζουμε την κλινική της σημασία.

Κλείνοντας, η ανίχνευση του Z αλληλόμορφου, σε ποσοστό 5% στους ασθενείς που εντάχθηκαν στη μελέτη, υποδεικνύει μια τάση συσχέτισης του Z παθολογικού αλληλόμορφου, με τις διακυμάνσεις της ηπατικής νοσολογίας στη CVID. Ενδεχομένως, μια προκαταρκτική γενετική εξέταση για ενδεχόμενη AATD, θα βοηθούσε σε μια πρώτη εκτίμηση για την ανάπτυξη της ηπατικής νόσου στους ασθενείς με CVID. Ωστόσο, για περαιτέρω διερεύνηση αυτής της υπόθεσης και προς ενίσχυση των αποτελεσμάτων μας, κρίνεται αναγκαίο μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] G. D. Billingsley, M. A. Walter, G. L. Hammond, and D. W. Cox, "Physical mapping of four serpin genes: alpha 1-antitrypsin, alpha 1-antichymotrypsin, corticosteroid-binding globulin, and protein C inhibitor, within a 280-kb region on chromosome I4q32.1.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 52, no. 2, pp. 343–353, Feb. 1993.
- [2] M. Brantly, T. Nukiwa, and R. G. Crystal, "Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency," *Am. J. Med.*, vol. 84, no. 6, pp. 13–31, Jun. 1988.
- [3] G. L. Long, T. Chandra, S. L. Woo, E. W. Davie, and K. Kurachi, "Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant.," *Biochemistry*, vol. 23, no. 21, pp. 4828–4837, Oct. 1984.
- [4] K. Morgan, S. Chappell, T. Guetta-Baranes, S. Morley, and N. Kalsheker, "The alpha-1-antitrypsin gene promoter in human A549 lung derived cells, and a novel transcription initiation site.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 5, pp. 1157–1164, May 2009.
- [5] "American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 168, no. 7, pp. 818–900, Oct. 2003.
- [6] D. W. Cox, S. L. Woo, and T. Mansfield, "DNA restriction fragments associated with alpha 1-antitrypsin indicate a single origin for deficiency allele PI Z.," *Nature*, vol. 316, no. 6023, pp. 79–81, Jul. 1985.
- [7] I. Blanco, F. J. de Serres, E. Fernandez-Bustillo, B. Lara, and M. Miravittles, "Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of α_1 -antitrypsin deficiency in European countries," *Eur. Respir. J.*, vol. 27, no. 1, p. 77 LP-84, Jan. 2006.
- [8] D. C. Hutchison, "Alpha 1-antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z.," *Respir. Med.*, vol. 92, no. 3, pp. 367–377, Mar. 1998.
- [9] S. Seixas, O. Garcia, M. J. Trovada, M. T. Santos, A. Amorim, and J. Rocha, "Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alpha1-antitrypsin polymorphism.," *Hum. Genet.*, vol. 108, no. 1, pp. 20–30, Jan. 2001.
- [10] T. Nukiwa *et al.*, "Identification of a second mutation in the protein-coding sequence of the Z type alpha 1-antitrypsin gene.," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 34, pp. 15989–15994, Dec. 1986.
- [11] M. H. Yu, K. N. Lee, and J. Kim, "The Z type variation of human alpha 1-antitrypsin causes a protein folding defect.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 2, no. 5, pp. 363–367, May 1995.

- [12] D. A. Lomas, D. L. Evans, J. T. Finch, and R. W. Carrell, "The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver.," *Nature*, vol. 357, no. 6379, pp. 605–607, Jun. 1992.
- [13] S. Eriksson, J. Carlson, and R. Velez, "Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 314, no. 12, pp. 736–739, Mar. 1986.
- [14] F. Ogushi, G. A. Fells, R. C. Hubbard, S. D. Straus, and R. G. Crystal, "Z-type alpha 1-antitrypsin is less competent than M1-type alpha 1-antitrypsin as an inhibitor of neutrophil elastase.," *J. Clin. Invest.*, vol. 80, no. 5, pp. 1366–1374, Nov. 1987.
- [15] D. A. Lomas *et al.*, "alpha 1-Antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) forms loop-sheet polymers in vivo. Evidence for the C sheet mechanism of polymerization.," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 28, pp. 16864–16870, Jul. 1995.
- [16] P. R. Elliott, D. Bilton, and D. A. Lomas, "Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 670–674, May 1998.
- [17] J. S. Parmar *et al.*, "Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 26, no. 6, pp. 723–730, Jun. 2002.
- [18] A. T. Mulgrew *et al.*, "Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant.," *Chest*, vol. 125, no. 5, pp. 1952–1957, May 2004.
- [19] Rouhani, Paone, Smith, Krein, Barnes, and Brantly, "Lung neutrophil burden correlates with increased pro-inflammatory cytokines and decreased lung function in individuals with alpha(1)-antitrypsin deficiency.," *Chest*, vol. 117, no. 5 Suppl 1, p. 250S–1S, May 2000.
- [20] D. A. Lomas, "The selective advantage of alpha1-antitrypsin deficiency.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 173, no. 10, pp. 1072–1077, May 2006.
- [21] R. A. Stockley and D. Burnett, "Alpha1-Antitrypsin and Leukocyte Elastase in Infected and Noninfected Sputum.," *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 120, no. 5, pp. 1081–1086, Nov. 1979.
- [22] H. Parfrey, T. R. Dafforn, D. Belorgey, D. A. Lomas, and R. Mahadeva, "Inhibiting polymerization: new therapeutic strategies for Z alpha1-antitrypsin-related emphysema.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 31, no. 2, pp. 133–139, Aug. 2004.
- [23] Y.-P. Chang, R. Mahadeva, W.-S. W. Chang, A. Shukla, T. R. Dafforn, and Y.-H. Chu, "Identification of a 4-mer peptide inhibitor that effectively blocks the polymerization of pathogenic Z alpha1-antitrypsin.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 35, no. 5, pp. 540–548, Nov. 2006.

- [24] Y.-P. Chang, R. Mahadeva, W.-S. W. Chang, S.-C. Lin, and Y.-H. Chu, "Small-molecule peptides inhibit Z alpha1-antitrypsin polymerization.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 8B, pp. 2304–2316, Aug. 2009.
- [25] M. Mallya *et al.*, "Small molecules block the polymerization of Z alpha1-antitrypsin and increase the clearance of intracellular aggregates.," *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 22, pp. 5357–5363, Nov. 2007.
- [26] A. Yoshida, C. Ewing, M. Wessels, J. Lieberman, and L. Gaidulis, "Molecular abnormality of PI S variant of human alpha1-antitrypsin.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 29, no. 3, pp. 233–239, May 1977.
- [27] R. Mahadeva *et al.*, "Heteropolymerization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis.," *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 7, pp. 999–1006, Apr. 1999.
- [28] C. JL, C. JR, P. RL, and R. TB, "Cirrhosis associated with partial deficiency of alpha-1 antitrypsin in an adult," *Ann. Intern. Med.*, vol. 78, no. 2, pp. 233–238, Feb. 1973.
- [29] G. M. Turino *et al.*, "Clinical features of individuals with PI*SZ phenotype of alpha 1-antitrypsin deficiency. alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 154, no. 6 Pt 1, pp. 1718–1725, Dec. 1996.
- [30] L. Fregonese and J. Stolk, "Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences," *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 3, p. 16, Jun. 2008.
- [31] H. Takahashi and R. G. Crystal, "Alpha 1-antitrypsin Null(isola di procida): an alpha 1-antitrypsin deficiency allele caused by deletion of all alpha 1-antitrypsin coding exons.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 47, no. 3, pp. 403–413, Sep. 1990.
- [32] M. Holmes, D. Curiel, M. Brantly, and R. G. Crystal, "Characterization of the intracellular mechanism causing the alpha-1-antitrypsin Nullgranite falls deficiency state.," *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 140, no. 6, pp. 1662–1667, Dec. 1989.
- [33] D. Curiel, M. Brantly, E. Curiel, L. Stier, and R. G. Crystal, "Alpha 1-antitrypsin deficiency caused by the alpha 1-antitrypsin Nullmattawa gene. An insertion mutation rendering the alpha 1-antitrypsin gene incapable of producing alpha 1-antitrypsin.," *J. Clin. Invest.*, vol. 83, no. 4, pp. 1144–1152, Apr. 1989.
- [34] J. Prins, B. B. van der Meijden, R. J. Kraaijenhagen, and J. P. M. Wielders, "Inherited chronic obstructive pulmonary disease: new selective-sequencing workup for alpha1-antitrypsin deficiency identifies 2 previously unidentified null alleles.," *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 1, pp. 101–107, Jan. 2008.
- [35] J. A. Carlson *et al.*, "Accumulation of PiZ alpha 1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice.," *J. Clin. Invest.*, vol. 83, no. 4, pp. 1183–1190, Apr. 1989.

- [36] M. J. Dyaico *et al.*, “Neonatal hepatitis induced by alpha 1-antitrypsin: a transgenic mouse model,” *Science*, vol. 242, no. 4884, pp. 1409–1412, Dec. 1988.
- [37] P. R. Elliott, D. A. Lomas, R. W. Carrell, and J. P. Abrahams, “Inhibitory conformation of the reactive loop of alpha 1-antitrypsin,” *Nat. Struct. Biol.*, vol. 3, no. 8, pp. 676–681, Aug. 1996.
- [38] B. Gooptu *et al.*, “Inactive conformation of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: implications for inhibitory function and conformational disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 1, pp. 67–72, Jan. 2000.
- [39] C. M. Cabral, Y. Liu, and R. N. Sifers, “Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 26, no. 10, pp. 619–624, Oct. 2001.
- [40] J. H. Teckman, J. Burrows, T. Hidvegi, B. Schmidt, P. D. Hale, and D. H. Perlmutter, “The proteasome participates in degradation of mutant alpha 1-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum of hepatoma-derived hepatocytes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 48, pp. 44865–44872, Nov. 2001.
- [41] N. Novoradovskaya, J. Lee, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, and M. Brantly, “Inhibition of intracellular degradation increases secretion of a mutant form of alpha1-antitrypsin associated with profound deficiency,” *J. Clin. Invest.*, vol. 101, no. 12, pp. 2693–2701, Jun. 1998.
- [42] Y. Wu, I. Whitman, E. Molmenti, K. Moore, P. Hippenmeyer, and D. H. Perlmutter, “A lag in intracellular degradation of mutant alpha 1-antitrypsin correlates with the liver disease phenotype in homozygous PiZZ alpha 1-antitrypsin deficiency,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 19, pp. 9014–9018, Sep. 1994.
- [43] P. R. Elliott, P. E. Stein, D. Bilton, R. W. Carrell, and D. A. Lomas, “Structural explanation for the deficiency of S alpha 1-antitrypsin,” *Nature structural biology*, vol. 3, no. 11, United States, pp. 910–911, Nov-1996.
- [44] T. R. Dafforn, R. Mahadeva, P. R. Elliott, P. Sivasothy, and D. A. Lomas, “A kinetic mechanism for the polymerization of alpha1-antitrypsin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 14, pp. 9548–9555, Apr. 1999.
- [45] N. G. McElvaney *et al.*, “Baseline characteristics of enrollees in the National Heart, Lung and Blood Institute Registry of alpha 1-antitrypsin deficiency. Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group,” *Chest*, vol. 111, no. 2, pp. 394–403, Feb. 1997.
- [46] E. Eden *et al.*, “Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 156, no. 1, pp. 68–74, Jul. 1997.
- [47] H. M. Morrison, J. A. Kramps, D. Burnett, and R. A. Stockley, “Lung lavage fluid from

patients with alpha 1-proteinase inhibitor deficiency or chronic obstructive bronchitis: anti-elastase function and cell profile.,” *Clin. Sci. (Lond).*, vol. 72, no. 3, pp. 373–381, Mar. 1987.

- [48] S. D. Shapiro, “Evolving concepts in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.,” *Clin. Chest Med.*, vol. 21, no. 4, pp. 621–632, Dec. 2000.
- [49] M. Hussain, G. Mieli-Vergani, and A. P. Mowat, “Alpha 1-antitrypsin deficiency and liver disease: clinical presentation, diagnosis and treatment.,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 14, no. 4, pp. 497–511, 1991.
- [50] J. McBean, A. Sable, J. Maude, and L. Robinson-Bostom, “Alpha1-antitrypsin deficiency panniculitis.,” *Cutis*, vol. 71, no. 3, pp. 205–209, Mar. 2003.
- [51] A. D. Mahr *et al.*, “Alpha(1)-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener’s granulomatosis.,” *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 12, pp. 3760–3767, Dec. 2010.
- [52] A. N. Elzouki, S. Eriksson, R. Lofberg, L. Nassberger, J. Wieslander, and S. Lindgren, “The prevalence and clinical significance of alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZ) and ANCA specificities (proteinase 3, BPI) in patients with ulcerative colitis.,” *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 5, no. 4, pp. 246–252, Nov. 1999.
- [53] A. N. Elzouki, M. Segalmark, P. Mazodier, and S. Eriksson, “Wegener’s granulomatosis in a patient with severe PiZZ alpha 1-antitrypsin deficiency.,” *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, vol. 89, no. 11, England, p. 877, Nov-1996.
- [54] F. Pons Romero, F. Casafont, C. Rodriguez de Lope, G. San Miguel, E. Artinano, and J. Cagigas, “Could alpha 1 antitrypsin deficiency have any role in the development of celiac sprue after gastric operations?,” *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 8, no. 5, pp. 559–561, Oct. 1986.
- [55] Z. Sun and P. Yang, “Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression.,” *Lancet. Oncol.*, vol. 5, no. 3, pp. 182–190, Mar. 2004.
- [56] A. N. Elzouki, A. Ryden Ahlgren, T. Lanne, B. Sonesson, and S. Eriksson, “Is there a relationship between abdominal aortic aneurysms and alpha1-antitrypsin deficiency (PiZ)?,” *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 17, no. 2, pp. 149–154, Feb. 1999.
- [57] A. Bofinger, C. Hawley, P. Fisher, N. Daunt, M. Stowasser, and R. Gordon, “Alpha-1-antitrypsin phenotypes in patients with renal arterial fibromuscular dysplasia.,” *J. Hum. Hypertens.*, vol. 14, no. 2, pp. 91–94, Feb. 2000.
- [58] A. A. Rabassa, M. R. Schwartz, and A. Ertan, “Alpha 1-antitrypsin deficiency and chronic pancreatitis.,” *Dig. Dis. Sci.*, vol. 40, no. 9, pp. 1997–2001, Sep. 1995.

- [59] H. Stone, A. Pye, and R. A. Stockley, "Disease associations in alpha-1-antitrypsin deficiency," *Respir. Med.*, vol. 108, no. 2, pp. 338–343, 2014.
- [60] M. E. SANSOM, B. L. FERRY, Z. P. M. C. SHERRELL, and H. M. CHAPEL, "A preliminary assessment of alpha-1 antitrypsin S and Z deficiency allele frequencies in common variable immunodeficiency patients with and without bronchiectasis," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 130, no. 3, pp. 489–494, Dec. 2002.
- [61] C. Cunningham-Rundles, "Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency.," *J. Clin. Immunol.*, vol. 9, no. 1, pp. 22–33, Jan. 1989.
- [62] R. A. Hermaszewski and A. D. Webster, "Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications.," *Q. J. Med.*, vol. 86, no. 1, pp. 31–42, Jan. 1993.
- [63] K. Warnatz *et al.*, "Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+))IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease.," *Blood*, vol. 99, no. 5, pp. 1544–1551, Mar. 2002.
- [64] J. C. Brouet, A. Chedeville, J. P. Femand, and B. Royer, "Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 30, no. 9, pp. 2516–2520, Sep. 2000.
- [65] A. Bryant, N. C. Calver, E. Toubi, A. D. Webster, and J. Farrant, "Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2.," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, vol. 56, no. 2, pp. 239–248, Aug. 1990.
- [66] N. D. Phung, R. J. Harbeck, and C. Helbling-Muntges, "Familial hypogammaglobulinemia. Genetic linkage with alpha 1-antitrypsin deficiency.," *Arch. Intern. Med.*, vol. 143, no. 3, pp. 575–577, Mar. 1983.
- [67] N. D. Phung, R. T. Kubo, and S. L. Spector, "Alpha 1-antitrypsin deficiency and common variable hypogammaglobulinemia in a patient with asthma.," *Chest*, vol. 81, no. 1, pp. 112–115, Jan. 1982.
- [68] M. E. Conley *et al.*, "Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 199–227, 2009.
- [69] C. D. Bird and N. J. Emery, "Insightful problem solving and creative tool modification by captive nontool-using rooks," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 25, pp. 10370–10375, Jun. 2009.
- [70] L. Wen, J. P. Atkinson, and P. C. Giclas, "Clinical and laboratory evaluation of complement deficiency.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 113, no. 4, p. 585–93; quiz 594, Apr. 2004.

- [71] V. Reid, M. Gleeson, N. Williams, and R. Clancy, "Clinical investigation of athletes with persistent fatigue and/or recurrent infections," *Br. J. Sports Med.*, vol. 38, no. 1, pp. 42–45, Feb. 2004.
- [72] A. Bergbreiter and U. Salzer, *Common variable immunodeficiency: A multifaceted and puzzling disorder*, vol. 5. 2009.
- [73] U. Salzer, K. Warnatz, and H.-H. Peter, *Common variable immunodeficiency – An update*, vol. 14. 2012.
- [74] L. Hammarström, I. Vorechovsky, and D. Webster, "Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID)," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 120, no. 2, pp. 225–231, May 2000.
- [75] G. Spickett, *Spickett, G.P. Current perspectives on common variable immunodeficiency (CVID). Clin. Exp. Allergy 31, 536-542*, vol. 31. 2001.
- [76] H. M. H. Sigstad, A. Stray-Pedersen, and S. S. Frøland, "Coping, quality of life, and hope in adults with primary antibody deficiencies," *Health Qual. Life Outcomes*, vol. 3, p. 31, May 2005.
- [77] S. Agarwal and C. Cunningham-Rundles, "Autoimmunity in Common Variable Immunodeficiency," *Curr. Allergy Asthma Rep.*, vol. 9, no. 5, pp. 347–352, Sep. 2009.
- [78] A. Bashir *et al.*, "Novel variants of SERPIN1A gene: Interplay between alpha1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease.," *Respir. Med.*, vol. 117, pp. 139–149, Aug. 2016.
- [79] M. P. Kaczor, M. Sanak, and A. Szczeklik, "Rapid and Inexpensive Detection of $\alpha(1)$ -Antitrypsin Deficiency-Related Alleles S and Z by a Real-Time Polymerase Chain Reaction Suitable for a Large-Scale Population-Based Screening," *J. Mol. Diagn.*, vol. 9, no. 1, pp. 99–104, Feb. 2007.
- [80] V. A. Hughes, R. Meklemburg, S. P. Bottomley, and P. L. Wintrobe, "The Z Mutation Alters the Global Structural Dynamics of $\alpha(1)$ -Antitrypsin," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, p. e102617, Sep. 2014.
- [81] J. K. Stoller, F. L. Lacbawan, and L. S. Aboussouan, "Alpha-1 Antitrypsin Deficiency," M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, Eds. Seattle (WA), 1993.
- [82] A. Graham, K. Hayes, S. Weidinger, C. R. Newton, A. F. Markham, and N. A. Kalsheker, "Characterisation of the alpha-1-antitrypsin M3 gene, a normal variant.," *Hum. Genet.*, vol. 85, no. 3, pp. 381–382, Aug. 1990.
- [83] R. G. Crystal, M. L. Brantly, R. C. Hubbard, D. T. Curiel, D. J. States, and M. D. Holmes,

“The alpha 1-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy.,” *Chest*, vol. 95, no. 1, pp. 196–208, Jan. 1989.

- [84] W. Poller *et al.*, “A leucine-to-proline substitution causes a defective alpha 1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease.,” *Genomics*, vol. 17, no. 3, pp. 740–743, Sep. 1993.
- [85] W. Poller *et al.*, “Molecular characterisation of the defective alpha 1-antitrypsin alleles PI Mwurzberg (Pro369Ser), Mheerlen (Pro369Leu), and Q0lisbon (Thr68Ile).,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 7, no. 3, pp. 321–331, Apr. 1999.
- [86] H. W. J. Schroeder *et al.*, “Physical linkage of a human immunoglobulin heavy chain variable region gene segment to diversity and joining region elements.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 21, pp. 8196–8200, Nov. 1988.